

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медико-фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медико-фармацевтичний університет

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

УСЕНКО ДМИТРО ЛЕОНІДОВИЧ

УДК 615.31:547.792].074:543.5.068

ДИСЕРТАЦІЯ

«АНАЛІТИЧНИЙ СУПРОВІД АФІ ТА ЛІКАРСЬКОЇ ФОРМИ НА ОСНОВІ
НАТРІЮ 2-((4-АМІНО-5-ТІОФЕН-2-ІЛМЕТИЛ)-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-
ІЛ)ТІО)АЦЕТАТУ ЗА ДОПОМОГОЮ ВЕРХ ТА ВЕРХ-МС»

226 «Фармація, промислова фармація»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

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

_____ Д. Л. Усенко

Наукові керівники – **Каплаушенко Андрій Григорович**, доктор
фармацевтичних наук, професор; **Борис Олександрович Варинський**,
доктор фармацевтичних наук, доцент.

Запоріжжя – 2026

АНОТАЦІЯ

Усенко Д. Л. Аналітичний супровід АФІ та лікарської форми на основі натрію 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою ВЕРХ та ВЕРХ-МС. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація». – Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, МОЗ України, м. Запоріжжя, 2026.

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, МОЗ України, м. Запоріжжя, 2026.

Робота виконана на базі кафедри фізколоїдної та аналітичної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету протягом 2022-2026 років.

Дисертаційна робота присвячена комплексному науково-експериментальному дослідженню (в рамках аналітичного супроводу) АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок, а також розробці, оптимізації та валідації ВЕРХ методик визначення. Робота спрямована на створення науково обґрунтованої системи підходів до якісного та кількісного аналізу АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату із застосуванням високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричним та мас-спектрометричним детектуванням.

У дослідженні використано рідинно-хроматографічну систему Agilent 1260 Infinity, оснащену діодно-матричним детектором і одноквадрупольним мас-спектрометром Agilent 6120 з іонізацією в електроспреї, а також ліцензійне програмне забезпечення OpenLAB CDS для збору та обробки аналітичних даних, що використовувалися для аналізу і кількісного

визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в потенційних субстанції і лікарській формі.

Аналіз літератури показав, що сучасна фармацевтична і медична практика володіє широким спектром застосовних фармакологічних засобів, серед яких похідні 1,2,4-тріазолу посідають особливе місце завдяки своїй багатогранній біологічній активності, дослідження яких особливо активно спостерігається в останні роки. Сполуки на основі 1,2,4-тріазолу характеризуються широким спектром фармакологічних властивостей, зокрема протигрибковою, протипухлинною, антиоксидантною, гепатопротекторною та противірусною дією, а в останні роки активно вивчаються протиракові властивості. До відомих представників даного класу сполук належать «Тіотріазолін», що широко використовується у клінічній практиці, а також ветеринарні препарати «Трифузол», «Авесстим» та «Тіометрізол», які демонструють високу ефективність і безпечність у застосуванні.

Особливий науковий інтерес становить натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат, що є новим активним фармацевтичним інгредієнтом (АФІ), що проявляє перспективні акто- та стреспротекторну активності. Фармакологічна дія АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату пов'язана з можливістю впливу на метаболічні процеси в клітинах, зокрема із стабілізацією клітинних мембран, зниженням рівня оксидативного стресу та підвищенням стійкості організму до гіпоксичних і токсичних факторів. З огляду на потенціал даного АФІ, його подальше впровадження у фармацевтичну практику потребує комплексного дослідження на всіх етапах життєвого циклу лікарського засобу, від доклінічних випробувань до промислового виробництва та контролю якості готових форм.

На кожному з цих етапів виникає потреба у створенні високочутливих, селективних і відтворюваних аналітичних методик, що забезпечують точне визначення вмісту діючої речовини в субстанціях, напівпродуктах та лікарських формах, а також виявлення та кількісну оцінку домішок, можливих

продуктів деградації і потенційних продуктів метаболізму. Такі методики також є незамінними при дослідженні фармакокінетичних параметрів і метаболічних шляхів АФІ у біологічних системах, що має вирішальне значення для оцінки безпечності та ефективності застосування АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

Відповідно до світових тенденцій у сфері сучасної фармацевтичної науки, спостерігається популяризація та зростання ролі вискоелективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), особливо у поєднанні з мас-спектрометричним (МС) або/та діодно-матричним детектуванням (ДМД). Окремо ВЕРХ, та ВЕРХ у поєднанні з детекторами, забезпечує високу точність, селективність та чутливість аналізу, дозволяючи не лише проводити якісну і кількісну ідентифікацію складних сполук, а й отримувати структурну інформацію про досліджувані речовини.

Аналіз патентної документації підтвердив відсутність охоронних документів, що стосуються використання ВЕРХ методик, та ВЕРХ у поєднанні з іншими детекторами, для визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та проміжних продуктів його синтезу. Це свідчить про наявність суттєвого науково-практичного пробілу у сфері аналітичного контролю нових представників даного класу сполук і, відповідно, про високий потенціал для створення інноваційних методів аналізу.

Отже, розроблення та систематизація комплексу аналітичних методик для визначення перспективних АФІ із групи похідних 1,2,4-тріазолів, а також проміжних продуктів їх синтезу, є актуальним і науково значущим напрямом сучасної фармацевтичної та медичної науки. Створення відповідного банку методик дозволить забезпечити належний контроль якості на всіх етапах розробки, виробництва та застосування лікарських засобів, сприятиме вдосконаленню системи фармацевтичного аналізу та підвищенню рівня вітчизняних фармацевтичних технологій до міжнародних стандартів.

У ході наукового дослідження, після детального огляду літературних джерел, було описано результати експериментального дослідження, спрямованого на підтвердження молекулярної маси та структури АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок, що утворюються на різних етапах його синтезу. Основним аналітичним інструментом для дослідження було обрано вискоєфективну рідинну хроматографію в поєднанні з мас-спектрометричним детектуванням (ВЕРХ-МС), що забезпечує високу чутливість, селективність і достовірність результатів. Дослідження мало на меті підтвердження ідентичності синтезованої сполуки шляхом порівняння експериментально отриманих мас-спектрів із теоретично очікуваними значеннями масових чисел квазімолекулярних іонів та аналізу характерних фрагментаційних шляхів. Ідентифікація проводилася як для основного активного фармацевтичного інгредієнта, так і для проміжних продуктів його синтезу, які потенційно можуть бути технологічними домішками. До таких сполук належать 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон.

Подальший фрагмент дослідження спрямований на визначення впливу вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі на параметри хроматографічного розділення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його супутніх домішок. Метою дослідження було встановлення оптимального складу елюенту для досягнення найкращої селективності, симетрії піків і ефективності розділення сполук. Хроматографічний аналіз проводили в ізократичному режимі за допомогою системи ВЕРХ. Як рухому фазу використовували суміш водного буферного розчину з 0,1% мурашиної кислоти та ацетонітрилу у різних співвідношеннях від 5% до 100% органічного модифікатора. Під час експериментів оцінювали вплив концентрації ацетонітрилу на час утримання, коефіцієнт ємності (k), роздільну здатність (R_s), асиметрію піків (T) та ефективність колонки (N) для

основної речовини й домішок. Збільшення концентрації ацетонітрилу до 30% призводило до зниження ефективності колонки та погіршення роздільної здатності, особливо для основної сполуки АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. У свою чергу, при 20% ацетонітрилу спостерігалася надмірна асиметрія піків для деяких домішок, що також знижувало якість розділення. Таким чином, концентрація 25% була визначена як оптимальна для кількісного визначення АФІ у присутності домішок, тоді як 20% є прийнятною для аналізу чистого зразка.

В роботі висвітлені результати дослідження впливу температури на характеристики хроматографічного утримання АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок, що є важливим етапом оптимізації умов ВЕРХ дослідження. Метою експерименту було встановлення закономірностей зміни коефіцієнта утримання (k) залежно від температури колонки, а також визначення термодинамічних характеристик процесу розподілу аналітів між рухомою та стаціонарною фазами, зокрема ентальпії перенесення (ΔH^0). Для кожної сполуки, а саме АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та трьох потенційних домішок 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату, 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону, визначали час утримування при температурному діапазоні від 30 до 70 °C із кроком 5 °C. Для точності розрахунків використовували референтну речовину KNO_3 , яка не взаємодіє зі стаціонарною фазою, що дозволило встановити мертвий час утримування ($t_0 = 0,6$ хв). На основі отриманих даних розраховували коефіцієнти ємності (k) та будували залежності $\ln k$ від $1/T$, які мали лінійний характер і відповідали рівнянню Вант-Гоффа. Лінійність графіків (коефіцієнти детермінації $R^2 > 0,93$) підтвердила, що зміна температури прямо впливає на рівновагу розподілу аналітів між фазами. Розраховані за кутовими коефіцієнтами ентальпії перенесення (ΔH^0) мали від'ємні значення для всіх сполук, що свідчить про екзотермічний характер процесу адсорбції. Це означає, що підвищення

температури супроводжується зменшенням часу утримування речовин на колонці, оскільки при зростанні температури рівновага зміщується у бік десорбції аналітів з поверхні сорбенту, що відповідає принципу Ле-Шательє.

Також, під дією еклектроспрею, досліджено мас-спектрометричну фрагментацію АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його супутніх домішок. Даний розділ роботи полягав у встановленні закономірностей фрагментації досліджуваних сполук для забезпечення їх надійної ідентифікації, а також у визначенні оптимальних умов іонізації та напруги фрагментації, які забезпечують максимальну чутливість і селективність аналізу. Напруга на фрагменторі варіювалася від 0 до 300 В, що дозволило простежити зміну інтенсивності та складу фрагментних йонів. Для АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за низької енергії фрагментації (100 В) визначено основний квазімолекулярний йон із m/z 271,2, а при підвищенні напруги спостерігалось поетапне утворення фрагментів, зокрема характерного тіофен-метильного катіону (m/z 97,1) та йонів із m/z 84, 69 і 60, що відображають руйнування 1,2,4-тріазольного ядра й ацетатної частини. Аналогічні закономірності виявлено для домішок, зокрема 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду та калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату. Для них при збільшенні енергії фрагментації також утворювалися типові фрагменти з m/z 97 (тіофен- CH_2^+), 53 (фрагмент розпаду тіофену) та 60 (гідразидний фрагмент). У результаті системного аналізу мас-спектрів за допомогою програмного забезпечення *Bruker Compass DataAnalysis* виконано обробку та деконволюцію даних для усунення перекриття піків і підвищення точності інтерпретації. Застосовано фільтрацію шуму та розрахунок ізотопних профілів, що дозволило підтвердити присутність атомів сірки й азоту у структурі фрагментів.

Розроблена та протестована в процесі дослідження методика ВЕРХ визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату була валідована, основна увага при цьому приділена

підтвердженню надійності, точності та відтворюваності аналітичного методу відповідно до сучасних вимог ДФУ та ЄФ. Розроблена методика характеризується високою точністю, відтворюваністю та селективністю. Вона відповідає вимогам чинних фармакопейних стандартів і може бути рекомендована для використання у контролі якості субстанції та у подальшому при розробці лікарських форм на основі АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Проведено оцінку екологічної безпеки розробленого ВЕРХ методу відповідно до принципів «зеленої» аналітичної хімії. Для цього застосовано метричні системи AGREE, які враховують усі етапи аналітичного процесу - від пробопідготовки до утилізації відходів. За результатами оцінки, показник «зеленості» методу за шкалою AGREE становив 0,74, що вказує на достатній рівень екологічної безпеки. Аналіз за індексом GAPI продемонстрував переважне «зелене» забарвлення пентаграм, підтверджуючи екологічну прийнятність розробленої методики. Єдиними факторами, що потенційно знижують її екологічність, є використання ацетонітрилу та енергозатратність роботи системи ВЕРХ.

Для створення потенційної лікарської форми парентерального застосування проведено експериментальне дослідження визначення ізотонічної концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Дослідження здійснювалося за допомогою криоскопічного методу відповідно до вимог ДФУ, що базується на вимірюванні депресії температури замерзання. У дослідженні аналізували 1% водний розчин АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, 0,9% розчин натрію хлориду, який використовувався як ізотонічний еталон, та воду високої чистоти Q3. Температуру кристалізації визначали за допомогою високочутливого термометра Бекмана. Після серії вимірювань було встановлено, що середня температура кристалізації води високої чистоти становить 5,10 °С, для 0,9% розчину натрію хлориду 4,53 °С, а для 1% розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату 4,91 °С. Відповідно, депресія точки замерзання для

натрію хлориду склала 0,57 °С, тоді як для досліджуваного АФІ - 0,19 °С. Отримані дані свідчать, що осмотичний тиск 1% розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату є нижчим за ізотонічний, тому необхідно визначити концентрацію, при якій розчин стане ізотонічним. На основі розрахунків встановлено, що ізотонічна концентрація для даної сполуки становить 3,0%, тобто 3,0 г АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у 100 мл розчину відповідають ізотонічному рівню. Для отримання ізотонічного 1% розчину необхідно додатково ввести еквівалентну кількість натрію хлориду, що компенсує дефіцит осмотичного тиску. Розрахунки показали, що на 100 мл 1% розчину потрібно додати 0,6 г натрію хлориду, що дозволяє досягти осмотичної рівноваги з плазмою крові.

Для встановлення стабільності АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату під дією типових деструктивних чинників, що можуть впливати на якість лікарських препаратів під час зберігання, транспортування або виробництва, а також підтвердження специфічності та надійності розробленої аналітичної методики контролю, було проведено дослідження з оцінки впливу різних стрес-факторів. Дослідження здійснювалося відповідно до вимог вітчизняних і міжнародних нормативних документів, що регламентують процедури оцінки стабільності лікарських речовин. Для експерименту використовували як чисту субстанцію, так і потенційну лікарську форму (1% водний розчин АФІ). У межах експерименту досліджували вплив різних дестабілізуючих чинників, а саме температури (70 °С), окисника (3% пероксид водню), кислотного та лужного гідролізу (0,1 М НСІ і 0,1 М NaOH відповідно), а також ультрафіолетового випромінювання. Крім того, вивчали стабільність зразків за умов зберігання при кімнатній температурі. Контроль кількісного вмісту АФІ проводився за допомогою ВЕРХ, а зміни концентрації визначали порівняно з вихідними зразками, прийнятими за 100%. Результати дослідження показали, що субстанція АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-

іл)тіо)ацетату характеризується високою стабільністю за більшістю умов, окрім впливу сильних окиснювальних агентів і тривалого ультрафіолетового опромінення. Зокрема, зберігання при лабораторних умовах, підвищеній температурі, а також у кислому та лужному середовищах не призвело до істотних змін кількісного вмісту АФІ (менше 0,5%). Водночас дія 3% пероксиду водню спричинила зниження концентрації активної речовини майже на 30%, а під впливом УФ-випромінювання вміст АФІ у 1% розчині зменшився більш ніж на 20% протягом чотирьох днів, що свідчить про його світлочутливість.

Для забезпечення гарантії якості, безпечності та ефективності лікарського засобу протягом усього періоду його зберігання, було проведено дослідження стабільності субстанції та лікарської форми на основі АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату з метою встановлення терміну придатності. Випробування стабільності проводили методом прискореного старіння, який базується на зберіганні зразків за підвищеної температури (40 °C), що дозволяє за короткий проміжок часу змодельовати процеси, еквівалентні тривалому зберіганню за звичайних умов (приблизно 20 °C). Експеримент тривав шість місяців і охоплював три серії кожного типу зразка, а саме субстанції та 1% водного розчину. Проби відбирали кожні 60 днів, після чого проводили ВЕРХ дослідження з визначенням кількісного вмісту АФІ, значень рН та візуальної оцінки зовнішнього вигляду. Результати свідчать про високу стабільність як субстанції, так і лікарської форми протягом експерименту. Визначено, що після 180 днів зберігання при 40 °C, що відповідає 720 дням (два роки) за нормальних умов, не спостерігається значних змін у кількісному вмісті діючої речовини, рН або зовнішньому вигляді. Значення рН залишалося стабільним на рівні 7,0-7,1, так як і концентрація АФІ.

В рамках роботи проведено комплексне експериментальне дослідження фармакокінетики та метаболізму АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Дослідження спрямоване на з'ясування

закономірностей абсорбції, розподілу, біотрансформації та елімінації сполуки, що є необхідним для визначення її ефективності, тривалості дії та безпечності. Експеримент проводили на щурах лінії «Вістар», яким вводили досліджуваний АФІ у дозі 100 мг/кг. Аналіз зразків плазми крові здійснювали за допомогою ВЕРХ. Отримані дані показали, що максимальна концентрація сполуки у плазмі крові спостерігається через 15 хвилин після введення, після чого відбувається поступове зниження її рівня, що має моноекспоненційний характер. Площа під фармакокінетичною кривою (AUC) склала 3,7088 мкг·год/мл, константа елімінації (K_{el}) - 0,1143 год⁻¹, а період напіввиведення ($T_{1/2}$) - 6,06 год, що свідчить про помірну швидкість виведення речовини та потенційно середню тривалість фармакологічної дії. Додатково досліджено процеси метаболізму сполуки із застосуванням хромато-мас-спектрометричного аналізу та хеметричних методів. Прогнозування метаболічних шляхів проводили з використанням онлайн-сервісу BioTransformer 3.0, що дозволило передбачити можливі реакції другої фази біотрансформації, зокрема О-глюкуронування, S-метилування, кон'югацію з гліцином і карнітином. Експериментально у плазмі крові щурів було виявлено сполуку з масою 328 m/z, яка відповідає можливому кон'югату з гліцином. Отримані результати підтверджені статистичним аналізом даних за методом часткових найменших квадратів (PLS-DA) з використанням програмного забезпечення MZmine 3.0 та онлайн-платформи MetaboAnalyst 6.0.

Результати дисертаційного дослідження впроваджено в навчальні та науково-дослідні програми ЗВО України.

Ключові слова: 1,2,4-тріазоли, ВЕРХ, ВЕРХ-МС, розробка методики, валідація, кількісне визначення, активний фармацевтичний інгредієнт, субстанція, фармакокінетика, метаболізм, *in silico*, ізотонічність, термін придатності.

ANNOTATION

Usenko D. L. Analytical support of the API and dosage form based on sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate using HPLC and HPLC-MS. – Qualification scientific work in manuscript form.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 22 «Health Care» in the specialty 226 «Pharmacy, Industrial Pharmacy» – Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2026

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2026.

The work was carried out at the Department of Physical, Colloidal and Analytical Chemistry of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University during 2022-2026.

The dissertation is devoted to a comprehensive scientific and experimental study (within the framework of analytical support) of the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate and its impurities, as well as to the development, optimization, and validation of HPLC methods for its determination. The work aims to create a scientifically grounded system of approaches to the qualitative and quantitative analysis of the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate using high-performance liquid chromatography with diode-array and mass-spectrometric detection.

The study employed an Agilent 1260 Infinity liquid chromatographic system equipped with a diode-array detector and a single-quadrupole Agilent 6120 mass spectrometer with electrospray ionization, as well as licensed OpenLAB CDS software for the acquisition and processing of analytical data, which were used for the analysis and quantitative determination of the API sodium 2-((4-amino-5-

(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in a potential substance and dosage form.

The literature review demonstrated that modern pharmaceutical and medical practice has a wide range of applicable pharmacological agents, among which 1,2,4-triazole derivatives occupy a special place due to their multifaceted biological activity; research on these compounds has intensified in recent years. Compounds based on the 1,2,4-triazole scaffold are characterized by a broad spectrum of pharmacological properties, including antifungal, antitumor, antioxidant, hepatoprotective, and antiviral activities; in recent years, their anticancer properties have been actively studied. Well-known representatives of this class include Thiotriazolin, widely used in clinical practice, as well as veterinary medicines Trifuzol, Avesstim, and Tiometrizol, which demonstrate high efficacy and safety. Of particular scientific interest is sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate, a new active pharmaceutical ingredient (API) exhibiting promising actoprotective and stress-protective activities. The pharmacological action of this API is associated with its ability to influence cellular metabolic processes, including stabilization of cell membranes, reduction of oxidative stress, and increased resistance of the organism to hypoxic and toxic factors. Given the potential of this API, its further implementation in pharmaceutical practice requires comprehensive investigation at all stages of the medicinal product life cycle, from preclinical studies to industrial manufacturing and quality control of finished dosage forms.

At each of these stages, there is a need to develop highly sensitive, selective, and reproducible analytical methods that ensure accurate determination of the active substance content in substances, intermediates, and dosage forms, as well as the detection and quantitative assessment of impurities, possible degradation products, and potential metabolites. Such methods are also indispensable for studying pharmacokinetic parameters and metabolic pathways of the API in biological systems, which is crucial for evaluating the safety and efficacy of sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate.

In accordance with global trends in modern pharmaceutical science, there is a growing popularity and increasing role of high-performance liquid chromatography (HPLC), especially in combination with mass-spectrometric (MS) and/or diode-array detection (DAD). HPLC alone, as well as HPLC combined with detectors, provides high accuracy, selectivity, and sensitivity of analysis, enabling not only qualitative and quantitative identification of complex compounds but also the acquisition of structural information on the studied substances.

Analysis of patent documentation confirmed the absence of protective documents related to the use of HPLC methods, including HPLC combined with other detectors, for the determination of the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate and intermediates of its synthesis. This indicates a significant scientific and practical gap in the field of analytical control of new representatives of this class of compounds and, consequently, a high potential for the development of innovative analytical methods.

Thus, the development and systematization of a set of analytical methods for the determination of promising APIs from the group of 1,2,4-triazole derivatives, as well as intermediates of their synthesis, is a relevant and scientifically significant direction of modern pharmaceutical and medical science. The creation of an appropriate method bank will ensure proper quality control at all stages of development, manufacturing, and application of medicinal products, contribute to the improvement of pharmaceutical analysis systems, and enhance domestic pharmaceutical technologies to international standards.

In the course of the scientific study, following a detailed review of the literature, the results of an experimental investigation aimed at confirming the molecular mass and structure of the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate and accompanying impurities formed at various stages of its synthesis were described. High-performance liquid chromatography combined with mass-spectrometric detection (HPLC-MS) was selected as the main analytical tool, providing high sensitivity, selectivity, and reliability of results. The study aimed to confirm the identity of the synthesized compound by comparing experimentally

obtained mass spectra with theoretically expected values of quasi-molecular ion masses and by analyzing characteristic fragmentation pathways. Identification was performed for both the main API and intermediates of its synthesis that may potentially act as technological impurities, including 2-(thiophen-2-yl)acetohydrazide, potassium 2-(2-(thiophen-2-yl)acetyl)hydrazine-1-carbodionate, and 4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazole-3-thione.

A subsequent part of the study was aimed at determining the effect of acetonitrile content in the mobile phase on chromatographic separation parameters of the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate and its accompanying impurities. The objective was to establish the optimal eluent composition to achieve the best selectivity, peak symmetry, and separation efficiency. Chromatographic analysis was performed in isocratic mode using an HPLC system. The mobile phase consisted of a mixture of an aqueous buffer solution with 0.1% formic acid and acetonitrile in various ratios from 5% to 100% organic modifier. During the experiments, the influence of acetonitrile concentration on retention time, capacity factor (*k*), resolution (*R_s*), peak asymmetry (*T*), and column efficiency (*N*) for the main compound and impurities was evaluated. Increasing the acetonitrile concentration to 30% led to a decrease in column efficiency and deterioration of resolution, especially for the main API compound. Conversely, at 20% acetonitrile, excessive peak asymmetry was observed for some impurities, also reducing separation quality. Thus, a concentration of 25% acetonitrile was determined to be optimal for quantitative determination of the API in the presence of impurities, whereas 20% was acceptable for analysis of a pure sample.

The work presents the results of studying the effect of temperature on chromatographic retention characteristics of the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate and accompanying impurities, which is an important stage in optimizing HPLC conditions. The objective was to establish patterns of changes in the retention factor (*k*) depending on column temperature and to determine thermodynamic characteristics of analyte

distribution between the mobile and stationary phases, particularly the enthalpy of transfer (ΔH^0). For each compound the API and three potential impurities (2-(thiophen-2-yl)acetohydrazide, potassium 2-(2-(thiophen-2-yl)acetyl)hydrazine-1-carbodionate, and 4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazole-3-thione) retention times were determined over a temperature range of 30 to 70 °C in 5 °C increments. Potassium nitrate (KNO_3), which does not interact with the stationary phase, was used as a reference compound to determine the dead time ($t_0 = 0.6$ min). Based on the obtained data, capacity factors (k) were calculated and $\ln k$ versus $1/T$ plots were constructed, showing linear behavior consistent with the van't Hoff equation. The linearity of the plots (coefficients of determination $R^2 > 0.93$) confirmed that temperature directly affects the equilibrium distribution of analytes between phases. Enthalpies of transfer (ΔH^0) calculated from the slopes had negative values for all compounds, indicating an exothermic adsorption process. This means that increasing temperature reduces retention times due to a shift of equilibrium toward desorption of analytes from the sorbent surface, in accordance with Le Chatelier's principle.

In addition, under electrospray ionization conditions, mass-spectrometric fragmentation of the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate and its accompanying impurities was investigated. This section aimed to establish fragmentation patterns to ensure reliable identification and to determine optimal ionization and fragmentor voltage conditions that provide maximum sensitivity and selectivity. Fragmentor voltage was varied from 0 to 300 V, allowing observation of changes in intensity and composition of fragment ions. For the API, at low fragmentation energy (100 V), the main quasi-molecular ion with m/z 271.2 was detected; with increasing voltage, stepwise formation of fragments was observed, including the characteristic thiophene-methyl cation (m/z 97.1) and ions with m/z 84, 69, and 60, reflecting cleavage of the 1,2,4-triazole core and acetate moiety. Similar patterns were observed for impurities, particularly 2-(thiophen-2-yl)acetohydrazide and potassium 2-(2-(thiophen-2-yl)acetyl)hydrazine-1-carbodionate, for which typical fragments at m/z 97 (thiophene- CH_2^+), 53

(thiophene decomposition fragment), and 60 (hydrazide fragment) were formed at higher fragmentation energies. As a result of systematic mass spectral analysis using Bruker Compass DataAnalysis software, data processing and deconvolution were performed to eliminate peak overlap and improve interpretation accuracy. Noise filtering and isotopic profile calculations were applied, confirming the presence of sulfur and nitrogen atoms in fragment structures.

The HPLC method for determining the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate developed and tested during the study was validated, with primary attention given to confirming reliability, accuracy, and reproducibility in accordance with current requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine and the European Pharmacopoeia. The developed method is characterized by high accuracy, reproducibility, and selectivity, complies with current pharmacopoeial standards, and can be recommended for quality control of the substance and for further development of dosage forms based on this API. The environmental safety of the developed HPLC method was assessed in accordance with principles of green analytical chemistry using AGREE metrics, which consider all stages of the analytical process from sample preparation to waste disposal. The AGREE greenness score was 0.74, indicating an acceptable level of environmental safety. GAPI index analysis demonstrated predominantly “green” pentagram coloration, confirming environmental acceptability. The only factors potentially reducing greenness are the use of acetonitrile and the energy consumption of the HPLC system.

To create a potential parenteral dosage form, an experimental study was conducted to determine the isotonic concentration of the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate. The study was performed using the cryoscopic method in accordance with the State Pharmacopoeia of Ukraine, based on measuring freezing point depression. A 1% aqueous solution of the API, a 0.9% sodium chloride solution used as an isotonic reference, and high-purity Q3 water were analyzed. Crystallization temperature was determined using a high-sensitivity Beckmann thermometer. After a series of measurements, the

average crystallization temperature of high-purity water was 5.10 °C, 4.53 °C for 0.9% sodium chloride solution, and 4.91 °C for the 1% API solution. Accordingly, freezing point depression was 0.57 °C for sodium chloride and 0.19 °C for the API. These data indicate that the osmotic pressure of the 1% API solution is lower than isotonic; therefore, the concentration at which the solution becomes isotonic was determined. Calculations showed that the isotonic concentration for this compound is 3.0%, i.e., 3.0 g of the API in 100 mL corresponds to isotonicity. To obtain an isotonic 1% solution, an equivalent amount of sodium chloride must be added to compensate for osmotic pressure deficiency; calculations showed that 0.6 g of sodium chloride per 100 mL of a 1% solution is required to achieve osmotic equilibrium with blood plasma.

To establish the stability of the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate under typical destructive factors affecting medicinal products during storage, transportation, or manufacturing, and to confirm specificity and reliability of the developed analytical control method, stress testing was conducted. The study was performed in accordance with national and international regulatory requirements governing stability assessment of pharmaceutical substances. Both the pure substance and a potential dosage form (1% aqueous solution) were investigated. The effects of various destabilizing factors were studied, including temperature (70 °C), oxidant (3% hydrogen peroxide), acidic and alkaline hydrolysis (0.1 M HCl and 0.1 M NaOH, respectively), and ultraviolet radiation. Stability under room temperature storage conditions was also evaluated. Quantitative API content was controlled using HPLC, and concentration changes were determined relative to initial samples taken as 100%. The results showed high stability of the API substance under most conditions, except exposure to strong oxidizing agents and prolonged UV irradiation. Storage under laboratory conditions, elevated temperature, and acidic or alkaline environments did not lead to significant changes in API content (less than 0.5%). In contrast, exposure to 3% hydrogen peroxide caused nearly a 30% decrease in active substance concentration, and UV

irradiation led to more than a 20% decrease in API content in the 1% solution over four days, indicating photosensitivity.

To ensure quality, safety, and efficacy of the medicinal product throughout its storage period, stability studies of the substance and dosage form based on the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate were conducted to establish shelf life. Stability testing was performed using accelerated aging, based on storage at elevated temperature (40 °C), allowing simulation of processes equivalent to long-term storage under normal conditions (approximately 20 °C). The experiment lasted six months and included three batches of each sample type (substance and 1% aqueous solution). Samples were taken every 60 days, followed by HPLC determination of API content, pH values, and visual assessment. The results indicate high stability of both the substance and dosage form throughout the experiment. After 180 days of storage at 40 °C, corresponding to approximately 720 days (two years) under normal conditions, no significant changes in API content, pH, or appearance were observed. pH values remained stable at 7.0-7.1, as did API concentration.

Within the framework of the work, a comprehensive experimental study of pharmacokinetics and metabolism of the API sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate was conducted. The study aimed to elucidate patterns of absorption, distribution, biotransformation, and elimination, necessary to determine efficacy, duration of action, and safety. The experiment was performed on Wistar rats administered the API at a dose of 100 mg/kg. Plasma samples were analyzed using HPLC. The obtained data showed that maximum plasma concentration occurred 15 minutes after administration, followed by a gradual monoexponential decrease. The area under the pharmacokinetic curve (AUC) was 3.7088 µg·h/mL, the elimination constant (K_{el}) was 0.1143 h⁻¹, and the half-life ($T_{1/2}$) was 6.06 h, indicating a moderate elimination rate and potentially medium duration of pharmacological action. Metabolic processes were additionally studied using chromatographic–mass spectrometric analysis and chemometric methods. Metabolic pathway prediction was performed using the online service

BioTransformer 3.0, which suggested possible phase II biotransformation reactions, including O-glucuronidation, S-methylation, and conjugation with glycine and carnitine. Experimentally, a compound with m/z 328 was detected in rat plasma, corresponding to a possible glycine conjugate. The results were confirmed by statistical analysis using partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) with MZmine 3.0 software and the MetaboAnalyst 6.0 online platform.

The results of the dissertation research have been implemented in educational and research programs of higher education institutions of Ukraine.

Keywords: 1,2,4-triazoles, HPLC, HPLC-MS, method development, validation, quantitative determination, active pharmaceutical ingredient, substance, pharmacokinetics, metabolism, in silico, isotonicity, expiration date.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Усенко, Д. Л., Каплаушенко, А. Г., & Варинський, Б. О. (2024). Визначення ізотонічності 1% розчину натрію 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*, 17, 1(44), 31-34. URL: <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2024.1.292556> (Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз та інтерпретація даних дослідження, обговорення результатів та підготовка оригінального тексту статті; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, написання та редагування, остаточне затвердження статті).
2. Usenko, D. L., & Kaplaushenko, A. G. (2024). Study of stress degradation and determination of the stability of the substance and injection solution of sodium 2-((4-amino-5-thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate. *Одеський медичний журнал*, 2(187), 85-89. URL: <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2024-2-15> (Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз та інтерпретація даних дослідження, обговорення результатів, підготовка та написання оригінального тексту статті; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, редагування, остаточне затвердження статті).
3. Usenko, D. L., Varynskyi, B. O., Kaplaushenko, A. G., Safonov, A. A., Panasenko, O. I., Morozova, L. P., Shmatenko, O. P., & Solomennyi, A. M. (2024). The research of pharmacokinetic parameters and metabolism of sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate for use in military and civilian medicine. *Український журнал військової медицини*, 5(4), 159-167. URL: [https://doi.org/10.46847/ujmm.2024.4\(5\)-159](https://doi.org/10.46847/ujmm.2024.4(5)-159) (Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз та інтерпретація даних дослідження, обговорення результатів та підготовка оригінального тексту статті).

статті; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, написання та редагування, остаточне затвердження статті; Сафонов А. А. – концепція дослідження, збір даних; Панасенко О. І. – концепція та дизайн дослідження; Морозова Л. П. – написання, редагування та остаточне затвердження статті; Шматенко О. П. – написання, редагування та остаточне затвердження статті; Соломенний А. М. – редагування та остаточне затвердження статті).

4. Усенко, Д. Л., Сафонов, А. А., Варинський, Б. О., Каплаушенко, А. Г. (2023). Спосіб кількісного визначення натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату (Патент на винахід № 127442). Укрпатент. URL:

<https://base.nipo.gov.ua/searchbulletin/search.php?action=viewdetails&dbname=invc&IdClaim=286029> (Дисертантом виконано експериментальне дослідження, аналіз наукової літератури та патентний пошук за направленням, підготовлено заявку до реєстрації в Укрпатенті; Сафонов А. А. – концепція дослідження; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, остаточне затвердження).

5. Usenko, D. L., Varynskyi, B. O., & Kaplaushenko, A. H. (2023). Thermodynamic Functions of Chromatographic Retention of Sodium 2-((4-Amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1, 2, 4-triazol-3-yl) thio) acetate and its Impurities. *Pharmakeftiki*, 35, II, 32-41. URL: https://www.hsmc.gr/wp-content/uploads/2015/12/farmakeftiki_2_2023.pdf (Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз результатів дослідження, обговорення результатів та підготовка оригінального тексту статті; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, написання та редагування, остаточне затвердження статті).

6. Усенко, Д. Л., Сафонов, А. А., Варинський, Б. О., Каплаушенко, А. Г. (2022). Дослідження прискореної деградації натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату. Науково-технічний прогрес і

оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали ІХ наук.-практ. конф. з міжнар.участю (22 - 23 вересня 2022 р.) (с. 92-93). ТНМУ, Тернопіль, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Сафонов А. А. – концепція дослідження; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

7. Усенко, Д. Л., Варинський Б. О., Каплаушенко А. Г. (2023). Визначення стабільності ін'єкційного розчину натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в ампулах методом "прискороного старіння". Безперервний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи: матер. наук.-практ. конференції з міжнар. участю, присвяченої 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету (1-2 листопада 2023 р.) (с. 235). НФаУ, Харків, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

8. Усенко, Д. Л., Варинський Б. О., Каплаушенко А. Г. (2023). Вивчення фармакокінетичних параметрів натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в сироватці крові щурів. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2023» (23-24 листопада 2023 р.) (с. 134). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

9. Усенко, Д. Л. (2024). Прогнозування, ідентифікація та хеометричний пошук метаболітів натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметіл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Тези доповідей 93 науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації» (28-30 березня 2024 р.) (с. 22). ІФНМУ, Івано-Франківськ, Україна. *(Дисертантом здійснено літературний пошук, експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, обговорення результатів та підготовка тез до друку).*

10. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Термодинамічні характеристики обернено-фазового хроматографічного утримання натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали X наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої пам'яті зав. каф. управління та економіки фармації з технологією ліків, д-ра фарм. наук, проф. Т.А. Грошового (17-18 жовтня 2024 р.) (с. 195). ТНМУ, Тернопіль, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

11. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Розробка методики детектування комплексу супутніх домішок натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою ВЕРХ-МС. Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації (Topical issues of clinical pharmacology and clinical pharmacy): матеріали наук.-практ. internet-конф. з міжнар. участю (29-30 жовтня 2024 р.) (с. 271). НФаУ, Харків, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

12. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Валідація методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою ВЕРХ-МС. Матеріали XII Науково-практичної конференції з міжнародною участю Школи молодих науковців АТ «Фармак» «НАУКА, ІННОВАЦІЇ ТА ЯКІСТЬ В СУЧАСНОМУ ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ» (28-29 листопада 2024 р.) (с. 100-101). АТ «Фармак», Київ, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

13. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Розробка та оптимізація умов ВЕРХ-МС детектування натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в комплексі з супутніми домішками. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2024» (21-22 листопада 2024 р.) (с. 119-120). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

14. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2025). Вивчення закономірностей мас-спектрометричного розпаду АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його супутніх домішок. VII науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (15 травня 2025 р.) (с. 304-305). НФаУ, Харків, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

15. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2025). Оцінка впливу на навколишнє середовище ВЕРХ методики кількісного визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія: збірник тез II Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 95-річчю Київського національного університету технологій та дизайну (30-31 жовтня 2025 р.) (с. 125). КНУТД, Київ, Україна. *(Дисертантом здійснено in silico дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

16. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2025). Аналітичний супровід АФІ та лікарської форми на основі натрію 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою ВЕРХ та ВЕРХ-МС. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2025» (20-21 листопада 2025 р.) (с. 140-141). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ ДИСЕРТАЦІЇ	21
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	32
ВСТУП	34
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ДО РОЗРОБКИ АНАЛІТИЧНИХ МЕТОДИК ВЕРХ ТА ВЕРХ-МС ПОХІДНИХ 1,2,4- ТРИАЗОЛУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	42
1.1 Існуючі методи хроматографічного аналізу похідних 1,2,4- тріазолу.....	43
1.2 Огляд підходів до оптимізації умов ВЕРХ та ВЕРХ-МС дослідження	52
1.3 Існуючі методи хроматографічного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів в плазмі крові.....	56
1.4 Існуючі методи дослідження прискореної деградації активних фармацевтичних інгредієнтів.....	58
1.5 Існуючі методи дослідження терміну придатності активних фармацевтичних інгредієнтів.....	60
1.6 Існуючі методи визначення ізотонічної концентрації активних фармацевтичних інгредієнтів.....	62
РЕЗЮМЕ	65
РОЗДІЛ 2 ОБЛАДНАННЯ, МЕТОДИ ТА РЕАКТИВИ, ВИКОРИСТАНІ В ПРОЦЕСІ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ	67
2.1 Об'єкти дослідження	67

2.1.1 Хімічні сполуки, що використані в синтезі активного фармацевтичного інгредієнту натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	67
2.1.2 Матеріал біологічного походження	68
2.2 Обладнання, прилади та програмне забезпечення	69
2.3 Хімічні реактиви та розчинники. Виготовлення та підготовка робочих розчинів	71
2.4 Основні законодавчі та нормативні документи	72
2.5 Розрахункові формули	72
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ НАТРІЙ 2-((4-АМІНО-5-ТІОФЕН-2-ІЛМЕТИЛ)-4 <i>H</i> -1,2,4-ТРІАЗОЛ-3-ІЛ)ТІО)АЦЕТАТУ ДОСЛІДЖЕННЯ ПАРАМЕТРІВ МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНОГО ДЕТЕКТУВАННЯ	73
3.1 Підтвердження молекулярної маси та будови натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок методом ВЕРХ-МС	73
3.1.1 Параметри виконання хроматографічного дослідження	73
3.1.2 Хроматографічне підтвердження молекулярної маси АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок	75
3.2 Дослідження характеристик хроматографічного утримання досліджуваних сполук від вмісту ацетонітрилу	82
3.2.1 Параметри виконання хроматографічного дослідження залежності АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі	83
3.2.2 Дослідження залежності хроматографічного утримання сполук від вмісту ацетонітрилу	85

3.3 Дослідження характеристик хроматографічного утримання досліджуваних сполук від температури.....	95
3.3.1 Параметри виконання хроматографічного дослідження залежності АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок від температури.....	96
3.3.2 Дослідження залежності хроматографічного утримання сполук від температури	96
3.4 Дослідження характеристик мас-спектрометричної фрагментації досліджуваних сполук	106
3.4.1 Параметри виконання хроматографічного дослідження мас-спектрометричної фрагментації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок	106
3.4.2 Дослідження закономірностей мас-спектрометричної фрагментації АФІ та домішок до нього при іонізації в електроспреї....	107
3.5 Валідація хроматографічної методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	126
3.5.1 Параметри виконання валідації ВЕРХ методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції.....	126
3.5.2 Дослідження чутливості та селективності ВЕРХ методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	128
3.5.3 Дослідження прецизійності, лінійності та правильності ВЕРХ методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	129
3.5.4 Оцінка впливу розробленої методики на навколишнє середовище за принципами «зеленої» аналітичної хімії	133
ВИСНОВКИ	134

РОЗДІЛ 4 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ РОЗРОБЛЕНОЇ ВЕРХ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ АФІ НАТРІЙ 2-((4-АМІНО-5-ТІОФЕН-2-ІЛМЕТИЛ)-4 <i>H</i> -1,2,4-ТРІАЗОЛ-3-ІЛ)ТІО)АЦЕТАТУ	136
--	-----

4.1 Визначення ізотонічної концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в потенційній лікарській формі для парентерального застосування	136
---	-----

4.1.1 Матеріали, реактиви та параметри виконання дослідження визначення ізотонічної концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	137
--	-----

4.1.2 Проведення дослідження визначення ізотонічної концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	138
--	-----

4.2 Дослідження впливу стрес-факторів на стабільність субстанції та ін'єкційного розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	142
--	-----

4.2.1 Матеріали, реактиви та параметри виконання дослідження впливу стрес-факторів на стабільність субстанції та ін'єкційного розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	143
---	-----

4.2.2 Проведення дослідження впливу стрес-факторів на стабільність субстанції та ін'єкційного розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	144
---	-----

4.3 Визначення стабільності для встановлення терміну придатності субстанції та лікарської форми на основі АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	148
---	-----

4.3.1 Матеріали, реактиви та параметри виконання дослідження стабільності для встановлення терміну придатності субстанції та	
--	--

лікарської форми на основі АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	149
4.3.2 Проведення дослідження стабільності для встановлення терміну придатності субстанції та лікарської форми на основі АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	150
4.4 Дослідження фармакокінетики та метаболізму натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	158
4.4.1 Параметри виконання дослідження фармакокінетики та метаболізму АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	159
4.4.2 Проведення дослідження фармакокінетики натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	160
4.4.3 Проведення дослідження метаболізму АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату	165
ВИСНОВКИ	170
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ	173
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	176
ДОДАТОК А АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ	199
ДОДАТОК Б СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА.....	208
ДОДАТОК В АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	214

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ	—	активний фармацевтичний інгредієнт;
ВЕРХ	—	високоєфективна рідинна хроматографія;
ВЕРХ-ДМД	—	високоєфективна рідинна хроматографія з діодно-матричним детектором;
ВЕРХ-ДМД-МС	—	високоєфективна рідинна хроматографія з діодно-матричним та мас-спектрометричним детекторами;
ВЕРХ-МС	—	високоєфективна рідинна хроматографія з мас-спектрометричною детекцією;
ДМД	—	діодно-матричний детектор;
ЛЗ	—	лікарський засіб;
МС	—	мас-спектрометрія;
УВЕРХ	—	ультрависокоєфективна рідинна хроматографія;
УФ	—	ультрафіолет;
ЯМР	—	ядерний магнітний резонанс;
DoE	—	Design of Experiment;
ESI	—	електроспрей іонізація;
HILIC	—	рідинна хроматографія з гідрофільною взаємодією;
HPLC	—	високоєфективна рідинна хроматографія;
HPLC-ESI-MS	—	високоєфективна рідинна хроматографія з електроспрей іонізацією мас-спектрометрією;
HPLC-MS	—	високоєфективна рідинна хроматографія з мас-спектрометричним детектором;

in silico	— комп'ютерне моделювання або розрахунки, проведені за допомогою програмного забезпечення;
LLOQ	— нижня межа кількісного визначення;
LOD	— межа виявлення;
LogD	— коефіцієнт розподілу;
LOQ	— межа кількісного визначення;
m/z	— відношення маси іона до його заряду;
RSD	— відносне стандартне відхилення;
S/N	— відношення сигнал/шум;
SIM	— режим вибіркового моніторингу іонів у мас-спектрометрії;
UPLC	— ультрависокоефективна рідинна хроматографія.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Сучасна фармацевтична наука та медицина активно використовують сполуки, що належать до класу похідних 1,2,4-тріазолу, завдяки їхній високій біологічній активності та широкому спектру фармакологічних властивостей. Представники цього хімічного класу відомі як ефективні протигрибкові, протипухлинні, антиоксидантні, гепатопротекторні та противірусні засоби. До добре вивчених і впроваджених у медичну практику препаратів на основі 1,2,4-тріазольного ядра належать «Тіотріазолін», а також ветеринарні засоби «Трифузол», «Авесстим», які демонструють високу терапевтичну ефективність. Одним із нових представників цього класу гетероциклічних сполук є натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат, що розглядається як активний фармацевтичний інгредієнт із вираженою акто- та стреспротекторною діями. На всіх етапах його впровадження у фармацевтичну практику, від доклінічних досліджень і клінічних випробувань, до фармацевтичного виробництва та контролю якості готових лікарських форм, виникає потреба у створенні точних, відтворюваних і валідованих аналітичних методик. Такі методики необхідні для контролю вмісту діючої речовини в сировині, напівпродуктах і готових формах, визначення можливих домішок, а також для дослідження метаболізму та фармакокінетики речовини.

Відповідно до сучасних світових тенденцій, у фармацевтичному аналізі спостерігається активне впровадження високоефективної рідинної хроматографії і ВЕРХ з мас-спектрометричною детекцією. Ці методи забезпечують високу чутливість, селективність і точність визначення навіть складних органічних сполук у багатокомпонентних матрицях. Однак аналіз літературних і наукових джерел свідчить, що для похідних 1,2,4-тріазолу рівень розвитку таких методик залишається недостатнім: здебільшого застосовуються потенціометричні або спектрофотометричні методи, які не

завжди забезпечують необхідну аналітичну надійність. Дослідження патентних джерел також підтвердило відсутність охоронних документів, які б описували методики ВЕРХ чи ВЕРХ-МС аналізу натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та проміжних сполук в його синтезі. Це свідчить про наявність наукової та практичної прогалини у сфері аналітичного супроводу створення нових фармацевтичних субстанцій і потребу в розробці інноваційних методів контролю якості для перспективних лікарських засобів.

Створення банку аналітичних методик для вивчення похідних 1,2,4-тріазолів та їхніх попередників у процесі синтезу є актуальним і необхідним завданням сучасної фармацевтичної науки. Сукупність наведених фактів підтверджує актуальність теми дослідження та доцільність проведення науково-дослідної роботи, спрямованої на розробку та оптимізацію високочутливих хроматографічних методів для аналізу нових потенційних АФІ.

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

Дисертаційну роботу виконано в рамках науково-дослідної роботи Запорізького державного медико-фармацевтичного університету МОЗ України, на тему: «Синтез та вивчення фізико-хімічних та біологічних властивостей речовин в ряду азагетероциклів. Створення та стандартизація оригінальних та комбінованих лікарських препаратів на основі похідних азагетероциклів. Розробка та валідація нових методик аналізу лікарських засобів» (номер державної реєстрації 0123U103937).

Мета і завдання дослідження

Основною метою роботи є аналітичний супровід АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції та потенційній лікарській формі, в тому числі при їх синтезі, зберіганні, а також вивченні поведінки в живому організмі.

Для реалізації вищезазначеної мети поставлені такі завдання:

- підтвердження будови та дослідження закономірностей хроматографічного утримання АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок від вмісту рухомої фази для визначення оптимальних умов розділення речовин, розробки і валідації методики визначення;
- визначення термодинамічних характеристик та вивчення залежності хроматографічного утримування АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та можливих домішок від температури;
- дослідження мас-спектрометричної фрагментації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та потенційних домішок, підбір оптимальних умов мас-спектрометричної детекції аналітів;
- валідація хроматографічної методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та оцінка впливу методики на навколишнє середовище;
- визначення ізотонічної концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в його потенційній лікарській формі для парентерального введення;
- аналіз впливу стрес-факторів на АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат та дослідження його стабільності при зберіганні задля визначення терміну придатності субстанції і потенційної лікарської форми;
- вивчення фармакокінетики і шляхів метаболізму АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

Об'єкт дослідження. Вивчення фізико-хімічних та аналітичних властивостей, стійкості, стабільності, хроматографічної та мас-спектрометричної поведінки АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-

1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок, розробка та валідація методики кількісного вивчення.

Предмет дослідження. Субстанція натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, домішки до АФІ, а саме 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат, 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон та 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)оцтова кислота.

Методи дослідження

Для аналізу і кількісного визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок в субстанції, потенційній лікарській формі, ідентифікації метаболітів та визначення залишкових кількостей АФІ у біологічному матеріалі використано високоефективну рідинну хроматографію, діодно-матричну детекцію, мас-спектрометрію з іонізацією в електроспреї. Для визначення рН застосовано рН-метрію. Визначення ізотонічності проводили кріоскопічним методом. Біологічними та фармако-токсикологічними методами проведено дослідження фармакокінетики. Розрахунки рівнянь поліноміальної регресії, визначення максимумів отриманих функцій і обчислення валідаційних характеристик розроблених методик здійснено із застосуванням методів математичної статистики. Для аналізу літератури використано бібліосемантичний метод, а також фрагментарно, штучний інтелект.

Наукова новизна отриманих результатів

В дисертації вперше оптимізовано хроматографічне розділення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок, отримані залежності хроматографічного утримання від вмісту рухомої фази та температури, розраховані термодинамічні показники і досліджено мас-спектрометричну фрагментацію всіх досліджуваних сполук.

Запатентована методика визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та потенційних домішок в

субстанції, потенційному лікарському засобі, плазмі крові вперше апробована на реальних зразках.

Здійснено дослідження осмоляльності та встановлено ізотонічну концентрацію АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, що дало змогу визначити необхідну кількість натрій хлориду необхідного для ізотонування нової лікарської форми, а саме 1% розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату для парентерального застосування.

Вперше отримано експериментальні дані механізму стресової деградації субстанції та 1% розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, досліджено стабільність та встановлено термін придатності субстанції і 1% розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

Новими є результати вивчення фармакокінетики та шляхів метаболізму АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в живому організмі.

Практичне значення отриманих результатів

В межах виконання дисертаційної роботи сформовано концепцію повного аналітичного супроводу АФІ та лікарської форми на основі натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату на всіх етапах розробки, дослідження та впровадження у виробництво і практику. Створено та валідовано ВЕРХ методику ідентифікації та кількісного визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в продуктах синтезу, субстанції, потенційній лікарській формі і в плазмі крові, методика має широке практичне застосування для контролю якості та безпеки на всіх стадіях виробництва.

Запропоновані закономірності фрагментації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та домішок можуть бути використані як основа для їх детектування, а також для визначення аналогічних за будовою сполук.

Отримані результати визначення ізотонічної концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в потенційній лікарській формі будуть використані в технологічному процесі, а також для розробки інших лікарських форм з оптимальними характеристиками біодоступності, стабільності, гарантованим рівнем безпечності та ефективності.

Дослідження впливу стрес-факторів на стабільність субстанції та 1% розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, а також встановлення терміну придатності, дозволяє встановити оптимальні умови зберігання, транспортування й використання субстанції та лікарської форми, що відповідають вимогам сучасного фармацевтичного контролю.

Результати роботи впроваджено в науковий і навчальний процес кафедр: фармацевтичної хімії Тернопільського національного університету ім. І. Я. Горбачевського; фармацевтичного управління, технології ліків та фармакогнозії Івано-Франківського національного медичного університету; загальної, органічної та фізичної хімії Національного університету біоресурсів і природокористування України; загальної хімії Національного фармацевтичного університету; фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова; загальної, біонеорганічної, фізколоїдної хімії ДНП «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького»; токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету; фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

Особистий внесок здобувача

Пошук, аналіз та узагальнення наукових публікацій, виконання практичної та експериментальної частини виконані особисто здобувачем. Постановка завдань, обговорення отриманих результатів, формулювання основних положень та висновків проводилися спільно з науковими

керівниками. Забір плазми крові щурів для дослідження фармакокінетики та вивчення шляхів метаболізму був здійснений за участі к. фарм.н. Михайлюка Є. О. та д. фарм.н., проф. Щербини Р. О., яким автор висловлює глибоку вдячність.

Опрацювання наукових літературних джерел, проведення патентного пошуку та систематизація результатів експериментальних досліджень проведеної роботи виконано автором дисертації особисто. Усі результати, подані до захисту, були узагальнені та науково інтерпретовані самим дисертантом, який також сформулював основні висновки роботи. Дані експериментальних досліджень оприлюднено у співавторських наукових публікаціях. Серед співавторів статей наукові керівники і дослідники, які брали участь у дослідженні.

Апробація матеріалів дисертації

Основні та найголовніші аспекти дисертаційної роботи представлено та обговорено на: IX Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (22-23 вересня 2022 р., м. Тернопіль), Науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченої 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету «Безперервний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи» (1-2 листопада 2023 р., м. Харків), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2023» (23-24 листопада 2023 р., м. Запоріжжя), 93 Науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «ІННОВАЦІЇ В МЕДИЦИНІ ТА ФАРМАЦІЇ» (28-30 березня 2024 р., м. Івано-Франківськ), X Науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченої пам'яті зав. каф. управління та економіки фармації з технологією ліків, д-ра фарм. наук, проф. Т.А. Грошового «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (17-18 жовтня 2024

р., м. Тернопіль), Науково-практичній internet-конференції з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації» (29-30 жовтня 2024 р., м. Харків), XII Науково-практичній конференції з міжнародною участю Школи молодих науковців АТ «Фармак» «НАУКА, ІННОВАЦІЇ ТА ЯКІСТЬ В СУЧАСНОМУ ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ» (28-29 листопада 2024 р., м. Київ), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2024» (21-22 листопада 2024 р., м. Запоріжжя), VII Науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «ВІД ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТА КЛІНІЧНОЇ ПАТОФІЗІОЛОГІЇ ДО ДОСЯГНЕНЬ СУЧАСНОЇ МЕДИЦИНИ І ФАРМАЦІЇ» (15 травня 2025 р., м. Харків), II Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченої 95-річчю Київського національного університету технологій та дизайну «Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія» (30-31 жовтня 2025 р., м. Київ), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2025» (20-21 листопада 2025 р., м. Запоріжжя).

Публікації

Основні результати дисертаційної роботи повністю відображені у 16 опублікованих наукових працях, з них 3 статті у фахових виданнях України, у тому числі в журналах, що індексуються наукометричною базою Scopus, 1 стаття у закордонному виданні, 1 патент України на винахід, та 11 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційну роботу викладено на 215 сторінках машинописного тексту, що складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу з матеріалами та методами дослідження, два розділи експериментальних досліджень, висновки, список використаних джерел та 3 додатків (17 сторінок). Роботу проілюстровано 22 таблицями та 64 рисунками. Список літератури містить 156 джерел (57 кирилицею, 99 латиницею).

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ДО РОЗРОБКИ АНАЛІТИЧНИХ МЕТОДИК ВЕРХ ТА ВЕРХ-МС ПОХІДНИХ 1,2,4-ТРІАЗОЛУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

На етапі підготовки до проведення практичної та експериментальної частини дослідження здійснено аналіз наукової літератури за темою роботи. Сучасні досягнення у сфері фармацевтичної науки свідчать про великий потенціал і домінацію застосування ВЕРХ та ВЕРХ-МС методів у дослідженні АФІ та існуючих лікарських засобів [1-6], включаючи похідні на основі ядра 1,2,4-тріазолу [7-15].

Виявлено, що сучасний розвиток аналітичної хімії у фармацевтичній науці та практиці свідчить про надзвичайно широкі можливості застосування ВЕРХ та її поєднання з мас-спектрометрією для аналізу АФІ та лікарських засобів. Метод посідає провідне місце серед сучасних аналітичних технологій завдяки своїй високій чутливості, точності та здатності ефективно аналізувати складні багатокomпонентні системи [16-23].

Використання ВЕРХ та ВЕРХ-МС забезпечує можливість якісного та кількісного визначення діючих речовин, домішок, продуктів деградації, а також метаболітів АФІ у біологічних та фармацевтичних матрицях. Сучасні тенденції у розвитку цих методів спрямовані на підвищення швидкості аналізу, роздільної здатності та відтворюваності результатів, що має важливе значення на всіх етапах - від контролю якості субстанцій до фармакокінетичних досліджень [24-33].

Аналіз наукових публікацій показує, що ВЕРХ і, особливо, ВЕРХ-МС стали невід'ємним інструментом у фармацевтичних дослідженнях [34-40]. Поєднання високої селективності хроматографічного розділення з можливістю мас-спектрометричної ідентифікації дозволяє з високою достовірністю визначати навіть низькі концентрації сполук у складних зразках. Це, у свою чергу, сприяє більш глибокому вивченню структури,

стабільності та метаболізму лікарських речовин, відкриваючи нові перспективи у створенні безпечних і ефективних препаратів.

В свою чергу сучасні досягнення у сфері фармацевтичної науки свідчать про значний потенціал синтетичної хімії в розробці нових лікарських засобів. Створення біологічно активних сполук є фундаментом для пошуку та розробки нових перспективних АФІ та фармакологічних препаратів. Існує широкий спектр синтетичних підходів до отримання речовин із вираженою біологічною активністю. Основною метою таких досліджень є одержання малотоксичних сполук, здатних демонструвати різноспрямовану фармакологічну дію.

Аналіз наукової літератури демонструє, що значні можливості для хімічного модифікування й створення нових активних субстанцій мають гетероциклічні системи, серед яких особливе місце посідають похідні 1,2,4-тріазолу. Встановлено [41-47], що сполуки цього класу характеризуються низькою токсичністю або практичною нетоксичністю, поєднуючи це з широким спектром фармакологічної активності. Введення до структури молекули фрагмента 1,2,4-тріазолу разом з аліфатичними, ароматичними або іншими гетероциклічними групами сприяє утворенню нових сполук із підвищеною біологічною ефективністю.

Основною метою цього розділу є систематизація та аналіз даних сучасних підходів до використання, створення та оптимізації методу ВЕРХ та ВЕРХ-МС при дослідженні АФІ та ЛЗ, а також АФІ та ЛЗ на основі ядра 1,2,4-тріазолу.

1.1 Існуючі методи хроматографічного аналізу похідних 1,2,4-тріазолу

Sangamithra R. та інші у своєму дослідженні [48] розробили та валідували метод ВЕРХ та рідинної хроматографії-тандемної мас-спектрометрії для 1,2,4-тріазольної протигрибкової сполуки. Стаціонарною фазою було обрано Chiralpak IG-3 (250 × 4,6 мм, 5 мкм) та (100 × 4,6 мм, 3

мкм). У якості рухомої фази для ВЕРХ було обрано етанол та діетиламін (співвідношення 100 до 0,1% об.), а для РХ-МС/МС ацетонітрил та 10 мМ бікарбонат амонію (співвідношення 90 до 10% об.). Автори дійшли висновку, що метод РХ-МС/МС є значно швидшим (загальний час аналізу 5 хв.) та набагато чутливішим (LOD на рівні нг/мл) порівняно з паралельно розробленою ВЕРХ методикою (LOD 4 мкг/мл).

У роботі Парченко В. та інші [49] наводять дані щодо розробки ВЕРХ-МС методики для визначення залишків АФІ ветеринарного препарату «Тріфузол-Нео» у коров'ячому молоці. Метод базується на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (30 мм × 4.6 мм; 1.8 мкм) та ізократичній рухомій фазі, що складається з 0,1% мурашиної кислоти у воді та 0,1% мурашиної кислоти в ацетонітрилі (співвідношення 70 до 30% об.). Пробопідготовка була простою і включала осадження білків молока мурашиною кислотою з подальшим центрифугуванням та фільтрацією. Метод показав добру лінійність у діапазоні 0.01-0.5 мкг/г. Межа кількісного визначення (LOQ) для АФІ в молоці становила 0.014 мкг/г. Методику було успішно застосовано для визначення АФІ у реальних зразках: через 24 години після введення препарату його залишкова концентрація в молоці склала 0.0695 мкг/г.

У дослідженні Nandagopal A. та Raju A. [50] представлено новий та надійний метод високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою для кількісного визначення перамівіру та його домішок, що пов'язана з 1*H*-1,2,4-тріазол-1-карбоксимідамідом, у лікарських речовинах нерозфасованої форми та ін'єкційних формах. Хроматографічне розділення було здійснено за допомогою колонки Agilent Eclipse-XDB C18 та рухомої фази, що складається з буферного розчину дигідрофосфату калію (рН 3,2) та ацетонітрилу (співвідношення 50 до 50% об.) зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв. Метод було валідовано відповідно до рекомендацій ICH Q2(R2) щодо специфічності, лінійності, меж виявлення (LOD) та кількісного визначення (LOQ), придатності системи, прецизійності, точності, надійності та стабільності. Результати дослідження показали, що метод є точним, відтворюваним та

надійним для одночасної оцінки основної речовини та його домішок, що є важливим для контролю фармацевтичної якості та подальших досліджень.

Варинський Б. та Каплаушенко А. у своєму дослідженні [51] шляхів фрагментації восьми 1,2,4-тріазол-3-тіонів (проміжні продуктами в синтезі АФІ) застосовували метод ВЕРХ-МС на основі хроматографічної колонки Zorbax SB-C18 (30 мм × 4.6 мм; 1.8 мкм) з оберненою фазою, в якості рухомої фази в ізократичному режимі використовували 0,1% мурашину кислоту у воді та 0,1% мурашину кислоту в ацетонітрилі (співвідношення 50 до 50% об.), швидкість потоку елюенту - 0,4 мл/хв. В результаті дослідження вченим вдалось інтерпретувати мас-спектри восьми 1,2,4-тріазол-3-тіонів та запропонувати шляхи фрагментації та закономірності розпаду іонів для досліджуваних сполук.

В наступній своїй роботі Варинський Б. та Каплаушенко А. [52] ідентифікували структуру основного метаболіту нового АФІ морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

Дослідження проводили методом ВЕРХ-МС (Agilent 1260/6120) на колонці Agilent Zorbax RX-SIL (4.6×50 мм, 1.8 мкм). Використовувалась ізократична рухома фаза, що складалася з 0.1% HCOOH в ацетонітрилі та 100 мМ HCOONH₄ у воді (співвідношення 80 до 20% об.). Аналіз показав, що вихідний АФІ з *m/z* 343 метаболізується до основного продукту з *m/z* 357. Різниця в 14 а.о.м. (атомних одиниць маси) відповідає реакції метилювання молекули. За допомогою квантово-хімічних розрахунків автори визначили, що найбільший негативний заряд знаходиться на атомі азоту N(4) 1,2,4-тріазольного кільця. Таким чином, авторами зроблено висновок, що основний метаболізм відбувається шляхом N-метилювання з утворенням 5-((карбоксиметил)тіо)-4-(2-метоксифеніл)-1-метил-3-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-1-ій катіону.

Сполуки класу 1,2,4-тріазолів часто виявляються як забруднювачі підземних вод. Їх потрапляння в довкілля пов'язане з тим, що вони утворюються як продукти розкладу низки фунгіцидів, широко застосовуваних у сільському господарстві, а також входять до складу захисних фарб. У

дослідженні [53] було запропоновано ефективну методику визначення 1,2,4-тріазолів із використанням твердофазної екстракції та високоефективної рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією (ТФЕ-ВЕРХ-МС/МС). Для аналізу використовували картриджі ENVI-Carb Plus (Supelco), які забезпечували майже повне вилучення аналітів - близько 100%, при цьому межа кількісного визначення становила приблизно 0,003 мкг/л.

У дослідженні Zhu X. та ін. [54], присвяченому синтезу 17 нових похідних тетралону, що містять 1,2,4-тріазольний фрагмент, з лонгіфолону, метод рідинної хроматографії використовувався для двох ключових завдань. По-перше, дослідники застосовували ВЕРХ Waters 1525, оснащеному колонкою SunFire C18 5 мкм (4,6 мм × 150 мм) для оперативного моніторингу перебігу фінальної реакції N-сульфонування, що дозволило контролювати завершеність процесу та його селективність. По-друге, для фінального підтвердження структури та молекулярних мас усіх синтезованих цільових сполук, поряд із методами ЯМР та ІЧ-спектроскопії, був використаний метод ВЕРХ-МС.

Щербина Р. та ін. [55] наводять дані щодо ідентифікації, визначення індивідуальності та чистоти продуктів при синтезі нових алкільних похідних 5-(2-бром-4-фторфеніл)-4-етил-4*H*-1,2,4-тріазол-3-тіолу. Означені аспекти для синтезованих сполук визначали за допомогою ВЕРХ-МС, використовуючи систему Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Німеччина) в парі з одноквадрупольним мас-спектрометром Agilent 6120 з іонізацією в електроспреї.

Сафонов А. [56] представляючи результати синтезу нових N'-заміщених 2-((5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетогідразидів ідентифікацію сполук визначали за допомогою ВЕРХ-МС, використовуючи систему Agilent 1260 Infinity та одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6120 з іонізацією в електроспреї. За результатами даних хроматограм у спектрі спостерігаються молекулярні піки зі значеннями m/z 270 та m/z 403, що відповідає розрахованому теоретичному значенню досліджуваних сполук 2-

((3-(тіофен-2-ілметил)-1*H*-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетогідразиду та 3-нітробензиліден-2-((5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетогідразиду.

У дослідженні за авторством Zvenihorodska T. та ін. [57], що присвячене цілеспрямованому синтезу двох нових хімічних сполук, які в одній молекулі поєднують біологічно активні фрагменти 1,2,4-тріазолу, 1,3,4-тіадіазолу та теофіліну для достовірного підтвердження успішного синтезу запланованих сполук автори використовували комплекс фізико-хімічних методів, зокрема і метод ВЕРХ-МС за допомогою якого вдалось ідентифікувати кінцеві продукти та підтвердити їхню молекулярну масу, що є ключовим етапом доведення структури та успішного синтезу нової речовини. У висновках роботи авторами зазначено, що обидві синтезовані сполуки виявили значну антимікробну та протигрибкову активність проти низки патогенних мікроорганізмів, зокрема *S. aureus* та *C. albicans*, показавши МІК 750 мкг/мл для більшості штамів.

Рароска R. та ін. провели синтез та біологічну оцінку нової серії похідних 1,2,4-тріазолу як потенційних ліків проти кишкових гельмінтів (нематод) [58] у зв'язку з ростом резистентності до існуючих препаратів. Автори досліджували протипаразитарну активність сполук на моделі нематод *Rhabditis sp.*, а також їхню токсичність та протизапальну дію на клітинах крові людини. У їхній роботі метод ВЕРХ використовувався як стандартний метод аналізу для ідентифікації та підтвердження чистоти новоотриманих сполук, доповнюючи дані ЯМР. У висновку 2 сполуки виявили значно вищу антигельмінтну активність, ніж еталонний препарат альбендазол, що робить їх перспективними кандидатами для подальшої розробки. Окрім того, одна сполука показала помітну протизапальну дію.

Дослідження Duc T. Pham та ін. [59] присвячене розробці нового, простого методу синтезу N,N-діетил-*m*-метилбензаміду (DEET) з *m*-толуїлової кислоти та діетиламіну із використанням 1,1'-карбонілді-(1,2,4-тріазолу) як агента конденсації. Автори запропонували удосконалений спосіб, який дає змогу уникнути токсичних реагентів, високих температур і складного

очищення продукту, властивих традиційним методам. Процес відбувається при 38-40 °C, з високим виходом (94-95%) і чистотою продукту 97-98%. Для кількісного визначення вмісту основної сполуки та підтвердження її чистоти, тобто для аналітичного підтвердження успішності реакції синтезу та відсутності домішок, використовували метод ВЕРХ. У результаті авторами показано, що запропонована методика є економічно вигідною, екологічнішою та більш ефективною, ніж раніше відомі методи, забезпечуючи просте очищення продукту та можливість масштабування процесу для промислового застосування.

1,2,4-тріазоли слугують ключовими проміжними продуктами у виробництві рибавіріну, препарату, що використовується для лікування гепатиту С, інфекцій респіраторно-синцитіального вірусу та вірусних геморагічних лихоманок. У дослідженні Černá, K. Ta Kozlík, P. [60] розробили швидкий та простий метод, що використовує ВЕРХ з УФ-детектуванням для визначення тріазолів, що використовуються в синтезі цих проміжних продуктів. Дослідники порівняли кілька нещодавно розроблених стаціонарних фаз змішаного режиму для рідинної хроматографії з класичною стаціонарною фазою C18. Використання нової колонки Astra DM з мультимодальною стаціонарною фазою дозволило швидко розділити всі аналіти протягом 3,2 хвилини, перевершуючи результати розділення зі стаціонарною фазою C18. Розроблений метод продемонстрував чудову лінійність з прийнятною точністю та рівнями прецизійності. Ці результати свідчать про те, що оптимізований метод підходить для рутинного аналізу відповідних речовин, що беруть участь у процесі синтезу, особливо коли необхідно визначити всі проміжні продукти рибавіріну.

Gloria A. та ін. [61] виконали дослідження (E)-1-(3-(3-гідрокси-4-метоксифеніл)-1-(3,4,5-триметоксифеніл)аліл)-1H-1,2,4-тріазолу та споріднених сполук, їх синтез та біологічна оцінка як нових засобів, спрямованих проти раку молочної залози, в якому, за допомогою ВЕРХ-МС, проводили оцінку чистоти та ідентифікацію сполук. ВЕРХ для визначення

чистоти продуктів проводили з використанням детектора з двома довжинами хвиль Waters 2487, бінарного насоса BEPX Waters 1525, дегазатора Waters In-Line Degasser AF, автосамплера Waters 717 plus та хроматографічної колонки з оберненою фазою Varian Pursuit XRs C18 розміром $150 \times 4,6$ мм з детекцією при 254 нм. Структурна модифікація, розроблена в цій роботі шляхом введення гетероциклу 1,2,4-тріазолу в структуру халконового каркасу, виявила провідні сполуки, які проявляють перспективні антипроліферативні властивості як агенти, що впливають на тубулін, та інгібітори ароматази, що мають потенційне застосування в лікуванні раку молочної залози.

Дослідження Giuso V. та ін. [62] описує синтез та вивчення властивостей нового хірального люмінесцентного комплексу з лігандом 1,2,4-тріазол-2,2'-дифенолу, який демонструє яскраве синьо-фіолетове світіння з високим квантовим виходом (до 32%). Оскільки під час синтезу утворюється рацемічна суміш, що складається з 50% одного енантіомера і 50% його дзеркального відображення, метод ВЕРХ відігравав у цій роботі ключову роль. Автори використали специфічний метод хіральної ВЕРХ (на колонці Chiralpak IB-N5) для фізичного розділення цієї суміші на два чистих енантіомери. Це дозволило у висновках дослідити унікальні оптичні властивості кожного з них окремо і, в поєднанні з комп'ютерним моделюванням, точно визначити їхню абсолютну 3D-конфігурацію.

Дослідження Muhamad M. та ін [63] було присвячене синтезу та біологічному вивченню нових похідних 1,2,4-тріазолу з ацетамідо-карбоновим фрагментом як потенційних інгібіторів фокальної адгезійної кінази (ФАК) - ферменту, який відіграє ключову роль у рості, виживанні та міграції пухлинних клітин. Дослідники отримали чотири нові сполуки і перевірили їхню протипухлинну активність на клітинах раку печінки. Найактивнішими виявилися дві сполуки, які продемонстрували сильне гальмування росту клітин та інгібування ФАК у наномолярних концентраціях. ВЕРХ у цьому дослідженні застосовували для контролю чистоти синтезованих сполук, зокрема для перевірки однорідності та підтвердження структури

найактивнішої сполуки лідера. Аналіз ВЕРХ із градієнтом метанолу у воді при швидкості 1,0 мл/хв показав наявність лише одного чистого хроматографічного піка, тобто зразок був чистим і придатним для подальших біологічних випробувань. У підсумку автори дійшли висновку, що синтезовані 1,2,4-тріазольні похідні є перспективними інгібіторами ФАК і мають значний потенціал як нові протиракові агенти, особливо сполука лідер, яка викликала зупинку клітинного циклу й апоптоз пухлинних клітин.

Нанопестициди на основі натуральних продуктів є ефективними і забезпечують сталий підхід до вирішення екологічних проблем, спричинених застосуванням сучасних комерційних гербіцидів. У дослідженні Li B. та ін. [64] провели синтез комплексів 4-метил-1,2,4-тріазол-тіоефір/нанохітозан, отриманих з L-карвону, як потужних нанопестицидів для сталого та ефективного гербіцидного застосування. Вдалось отримати та структурно охарактеризувати за допомогою ІЧ-спектроскопії, ЯМР-спектроскопії та методу мас-спектроскопії високої чутливості 21 нову похідну 4-метил-1,2,4-тріазол-тіоефіру. Чистоту та первинну ідентифікацію нових сполук перевіряли методом ВЕРХ. За результатом дослідження авторами [64] було виявлено, що дві сполуки проявляють значну гербіцидну активність. Серед них одна має великий потенціал як «зелений» та екологічно чистий нанопестицид для боротьби з бур'янами.

У роботі Аран А. та ін. [65] вивчали ліпофільність, що є ключовим параметром для прогнозування біодоступності, токсичності та активності потенційних лікарських засобів. Об'єктом дослідження стали 32 нові похідні тіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазолу та імідазо[2,1-*b*][1,3,4]тіадіазолу, які продемонстрували протизапальну активність. Для експериментального визначення ліпофільності використовували обернено-фазову тонкошарову хроматографію, що є аналогом обернено-фазової ВЕРХ. Результати хроматографічного аналізу порівнювали з теоретичними LogP та LogD значеннями, розрахованими різними комп'ютерними методами. ВЕРХ використовували як модель і ключовий підхід для вимірювання ліпофільності,

що імітує розподіл речовин у біологічних системах (між водним середовищем організму та ліпідними мембранами). Саме через такі властивості ВЕРХ є еталонним методом для оцінки цього параметра. У результаті дослідниками виявлено, що ліпофільність залежить від будови молекули і типу замісників, а найліпофільнішими були сполуки з атомами бром у й хлору. Отримані експериментальні параметри добре корелювали з розрахунковими, що підтверджує достовірність методики.

Alsulaimany M. та ін [66] виконали дослідження, присвячене розробці нових протигрибкових сполук на основі 1,2,4-тріазолу, які спрямовані на подолання резистентності *Candida albicans* до відомих азольних препаратів, таких як флуконазол. Вчені синтезували серію похідних флуконазолу з середніми та довгими бічними ланцюгами, які покликані покращити зв'язування з ферментом стерол-14 α -деметилазою, яка є основною мішенню азолів та бере участь у синтезі ергостеролу в грибовій мембрані. Для оцінки активності нових сполук проводили тести на мінімальну інгібуючу концентрацію, інгібування ферменту CYP51 і визначення константи зв'язування. Найкращі результати [66] показали сполуки з амідним лінкером і дихлоробензеновим фрагментом, які мали активність, порівнянну або навіть кращу за флуконазол, а також проявляли ефективність проти резистентних штамів і високу селективність щодо грибового ферменту, одночасно не впливаючи на людський CYP51. На етапі контролю чистоти та підтвердження структури синтезованих сполук автори [66] використовували метод ВЕРХ. Хроматографічний аналіз дозволив перевірити, що кожен зразок є однорідним, без домішок, і підходить для подальших біологічних випробувань, а також застосовувався для ідентифікації продуктів реакції та контролю виходу під час синтезу проміжних і фінальних сполук. У висновках зазначено, що нові 1,2,4-тріазольні похідні з довгими бічними ланцюгами, мають високу протигрибкову активність навіть проти стійких штамів, покращену здатність зв'язуватися з ферментом-мішенню та кращі фізико-хімічні властивості порівняно з комерційними аналогами. Це робить їх перспективними

кандидатами для створення нового покоління азольних протигрибкових засобів.

Федотов С. та Гоцуля А. у своїй роботі представили синтез нових сполук S-алкіл-4-аміно-5-(5-(3-фторфеніл)-піразол-3-іл)-1,2,4-тріазол-3-тіолових похідних [67], ідентифікацію яких проводили за допомогою ВЕРХ-МС.

1.2 Огляд підходів до оптимізації умов ВЕРХ та ВЕРХ-МС дослідження

При оптимізації умов ВЕРХ чи ВЕРХ-МС за сучасними підходами *першочергово формулюють аналітичні цілі* (цільові аналіти, матриця, цільова чутливість, вимоги до селективності й часу аналізу) і проводять систематичне багатовимірне дослідження варіабельних факторів замість поодинокого «ручного» підбору параметрів; цю стратегію активно просувають підходи Quality-by-Design і Design-of-Experiments (DoE), котрі дозволяють одночасно оцінити вплив стаціонарної фази, складу рухомої фази, рН, потоку й температури та виявити необхідні компроміси між розділенням і швидкістю. Детальні огляди і приклади застосування DoE до розробки ВЕРХ чи ВЕРХ-МС методів показують, як це зменшує число експериментів і підвищує стійкість методу [68].

Вибір колонки залишається одним із найвпливовіших факторів на умови ВЕРХ чи ВЕРХ-МС. Сучасні рекомендації, згідно з проведеного огляду літератури, підкреслюють, що не лише клас (C18, RPFP, феніло-гексил, тощо), а й розмір часток, пористість та хімічна модифікація поверхні визначають утримування і форму піку для кислотних, нейтральних або основних сполук. У практиці розробки часто порівнюють декілька типів хроматографічних колонок (традиційні C18, модифіковані «водні» фази для робочих розчинів із високим вмістом води, PFP/DA-фази для полярних/ароматичних сполук) як початковий крок перед тонкою оптимізацією рухомої фази [69].

Склад рухомої фази і рН буфера прямим чином визначають селективність і іонізацію в ESI-джерелі. Для ВЕРХ-МС віддають перевагу

летким буферам (форміат/ацетат амонію в низьких концентраціях) або системам з коригованим рН замість сильних нелетких солей, оскільки надлишок солей і висока буферна концентрація викликають пригнічення іонізації і накопичення на джерелі. Крім того, перехід від метанолу до ацетонітрилу або навпаки може суттєво вплинути на чутливість і селективність, тому ці зміни обов'язково тестують у DoE-підході [68], який описано перед цим.

Окрему увагу приділяють практичним аспектам впливу *віку й стабільності рухомої фази*. Останні дослідження показують, що окиснення або агрегація домішок у розчинниках та у мобільній фазі може поступово знижувати МС-чутливість і змінювати структуру піку, тому наукова література рекомендує включати контроль чистоти розчинників, регулярну заміну чи очистку (методом промивання) мобільною фазою [70].

Для параметрів елюювання практично завжди *досліджують градієнтні профілі* як спосіб одночасно підвищити розділення полярних і ліпофільних компонентів і скоротити час аналізу, а потік, температура колонки й об'єм ін'єкції оптимізують для балансу між ефективністю колонки і чутливістю МС. У випадках аналізу дуже полярних сполук, для розширення діапазону їх утримування [69], розглядають альтернативи типу HILIC або двоколонкового підходу (C18 + HILIC).

Не менш важливим є *оптимізувати переданалітичну підготовку проб* (проводити якісну пробопідготовку). Протоколи SPE, мікро-SPE, екстракція розчинником, осадження білків або інші типи очищення впливають як на відновлення аналітів, так і на матричні ефекти в іонізації. Сучасні наукові дослідження рекомендують впроваджувати DoE і для кроків пробообробки (наприклад, відбір сорбенту, рН екстракції, об'єм елюенту) аби мінімізувати матричні інтерференції і знизити пригнічення сигналу [71].

У частині *налаштувань мас-спектрометра* при роботі з ESI типово оптимізують параметри дезольвації, тиску газу розпилювача, напруги і температури вхідного контуру, а також проводять дослідження на предмет

матричного пригнічення через постколонкові введення стандартів, адже поєднання хроматографічної сепарації і правильних умов джерела часто дає більший приріст чутливості [72].

Одним з обов'язкових етапів є багатофакторна *валідація й випробування стійкості*, які підтверджують, що невеликі зміни рН, температури чи складу рухомої фази не призводять до неприйнятних відмінностей у результатах. Поєднання DoE на етапі розробки і класичної валідації гарантує, що розроблений ВЕРХ/ВЕРХ-МС метод підходить для рутинного застосування в умовах контролю якості чи біоаналізу [68].

Загалом, в багатьох наукових статтях описуються різні підходи до оптимізації умов ВЕРХ чи ВЕРХ-МС дослідження, але всі вони опираються на методи, описані вище.

У роботі Dhumi P. та співавторів [73] продемонстровано практичне застосування DoE для одночасної розробки LC- та MS-параметрів біоаналітичного методу: автори варіювали відсоток органічного розчинника, концентрацію кислотного модифікатора і потік у хроматографічній частині, а також окремо оптимізували ключові параметри джерела іонізації в MS. Важливо, що у публікації показано, як поєднання LC-DoE і окремих експериментів з MS дозволяє досягти бажаної чутливості й мінімізувати матричні ефекти у плазмі.

У праці Manasa A. та співавторів [74] описано комплексний підхід до оптимізації SPE-LC-MS/MS методу для багатокласових нутрієнтів із різних харчових матриць. Автори застосували DoE для відбору ключових параметрів пробообробки (тип сорбенту SPE, рН розчинника екстракції, об'єм елюенту) і одночасно оптимізували хроматографічний градієнт та умови MS. Робота авторів [74] демонструє, що оптимізація пробообробки через DoE часто дає більший вплив на кінцеву відтворюваність і LLOQ, ніж локальне «ручне» тонке налаштування хроматографії.

У 2022 році Suárez-González J. разом з іншими науковцями [75] застосували комбінований підхід DoE плюс мультилінійну регресію (MLR)

для розробки та оптимізації нового UPLC-UV/MS методу для виявлення субстандартних препаратів від туберкульозу. У статті детально описано, як DoE використовували для попереднього скринінгу факторів (колонка, початкова частка органіки, час градієнту, температура), після чого MLR допоміг кількісно змодельовати вплив факторів на метрики якості піків і вибрати компромісні умови для рутинного застосування. Приклад показовий тим, що статистичні моделі можна поєднувати з регресійними підходами для отримання інтерпретованих прогнозів.

У роботі Rocha A. та Lourenço F. [76] продемонстровано застосування концепції Analytical Quality-by-Design (AQbD) при розробці LC-MS/MS-методу для кількісного визначення лозартану, гідрохлортіазиду та їх домішок. Автори почали з чіткого визначення аналітичного цільового профілю (АТР), провели бібліографічний аналіз властивостей сполук, використали скринінгові плани для виявлення критичних факторів, а потім застосували центральноміксовий дизайн для точкового налаштування критичних факторів (рН, % органіки, температура, потік елюенту) та оцінки зони робочих умов. Робота ілюструє, як AQbD об'єднує DoE, ризик-орієнтований підхід і вимоги до валідації методики.

У праці Havrylenko O. та ін. [77] головний підхід оптимізації ВЕРХ полягав у балансуванні роздільної здатності та часу аналізу шляхом ретельного підбору хроматографічних умов. Основним технічним рішенням став вибір короткої колонки Zorbax SB-Aq (50 мм × 4,6 мм, 5 мкм), яка, на відміну від довших колонок, що застосовуються в існуючих фармакопейних методиках, забезпечила гостріші піки та покращену роздільну здатність для низькоконцентрованих АФІ, зокрема фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату. Це мало вирішальне значення для забезпечення точності кількісного визначення. Крім того, дослідниками була проведена систематична оптимізація градієнтного елюювання для досягнення ефективного розділення всіх трьох досліджуваних АФІ та критичної домішки (4-амінофенолу) за мінімальний час. У результаті цієї оптимізації було

досягнуто скорочення часу аналізу до 10 хв для кількісного визначення АФІ та 20 хв для аналізу домішки, що вдвічі швидше, ніж офіційні методики. Важливим аспектом, що підвищує практичність методу, є уніфікація мобільної фази для всіх розроблених методик, яка складається з розчину натрію октансульфонату (1,1 г/л, рН 3,2) і метанолу. Використання іонопарного реагенту (натрію октансульфонату) та підтримання кислого рН дозволило забезпечити ідеальну симетрію піків для полярних сполук. Така уніфікація спрощує процедури, знижує витрати на реагенти та мінімізує операційні помилки при рутинному контролі, відповідаючи сучасним вимогам «зеленої хімії».

1.3 Існуючі методи хроматографічного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів в плазмі крові

При дослідженні фармакокінетики та потенційних метаболітів калій 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату на щурах Щербина Р. у своїй роботі [78] застосовував метод ВЕРХ-МС. Застосовувалась хроматографічна колонка ZORBAX RX-SIL (50 × 4,6, 1,8 мкм) з температурою на рівні 40 °С. Рухома фаза складалася з 70% ацетонітрилу (0,1% HCOOH) та 30% H₂O (100 мМ HCOONH₄). Швидкість потоку рухомої фази становила 0,400 мл/хв. Введений об'єм становив 20 мкл для ідентифікації метаболітів та 2 мкл для фармакокінетичного дослідження. Сканування проводилося в діапазоні *m/z* 100-1000 для ідентифікації метаболітів. Режим SIM для фармакокінетичного дослідження був при *m/z* 274 та *m/z* 547. Напруга на фрагменторі 10 В у режимі позитивної полярності. За допомогою отриманих даних ВЕРХ-МС успішно встановлено період напіввиведення калій 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату з сироватки крові (*t*_{1/2} = 0,32 год) та було визначено можливі метаболіти досліджуваної речовини при внутрішньошлунковому введенні щурам.

Gunawan U. та ін. у своєму огляді [79], який фокусується на проблемі терапевтичного моніторингу ліків для тріазольних протигрибкових препаратів (таких як вориконазол, флуконазол), що використовуються для лікування небезпечних інвазивних грибкових інфекцій, провели кропіткий аналіз існуючих аналітичних методів кількісного визначення сполук. Оскільки ці ліки мають вузький терапевтичний діапазон, ВЕРХ та більш просунуті варіації методу (ВЕРХ-МС, УВЕРХ-МС та ін.) використовуються як ключовий інструмент для точного кількісного визначення концентрації цих препаратів у біологічних рідинах пацієнтів (плазмі, сироватці). Це дозволяє лікарям індивідуально підбирати дозу, щоб забезпечити ефективність лікування та уникнути токсичності. У висновках автори зазначають, що хоча ВЕРХ є доступним методом і часто використовується у подібних дослідженнях і при роботі з біологічними рідинами, саме УВЕРХ-МС є найкращим підходом завдяки своїй винятковій чутливості, специфічності та високій швидкості аналізу.

Elbarbry F. та співавтори представили валідований, чутливий ВЕРХ-МС метод для кількісного визначення нових протипухлинних 1,5-діарил-1,2,4-тріазол сульфонамідів з подвійною цільовою дією у плазмі людини [80]. Представлений аналіз буде дуже важливим для майбутніх доклінічних досліджень та терапевтичного моніторингу препаратів. Після осадження білка ацетонітрилом, аналіти та внутрішній стандарт були розділені на хроматографічній колонці Phenomenex Kinetex C18 з використанням бінарного градієнтного елюювання. Рухома фаза складалась з 0,1% мурашиної кислоти у воді та ацетонітрилу (95 до 5% об.) зі швидкістю 0,7 мл/хв. Загальний час аналізу становив менше 6 хвилин. Для виявлення використовувався потрійний квадрупольний мас-спектрометр API 3500 з електроспрей іонізацією в позитивному режимі. Метод був повністю валідований, демонструючи прийнятну лінійність, точність, прецизійність, селективність та стабільність. Метод був успішно застосований до плазми

людини з додаванням амінокислот, що підтверджує його потенціал для терапевтичного моніторингу лікарських засобів.

Liang H. та співавтори проводили дослідження фармакокінетики та розподілу в тканинах нових протиепілептичних сполук 2-(2-фторфеніл)-5-феніл-7-алкокси-[1,2,4]тріазол[1,5-а]піримідину після внутрішньочеревного введення щурам за допомогою методу ВЕРХ-МС [81].

При вивченні нового протиепілептичного кандидата, який належить до класу 1,2,4-тріазол-3-тіонів, у Makuch-Koska A. та ін. дослідників було завдання оцінити вплив тривалого застосування цієї сполуки на організм, зокрема її можливу токсичність і взаємодію з ферментами системи [82]. Сполуку вводили мишам протягом 14 днів, після чого проводили біохімічні, морфологічні та гістопатологічні аналізи, щоб перевірити функції печінки, нирок і кровоносної системи. Результати показали, що сполука не виявляє гепато- чи нефротоксичності, не викликає змін у складі крові та не впливає на морфологію внутрішніх органів. ВЕРХ з флуоресцентним детектором використовували для кількісного визначення концентрації досліджуваної сполуки у сироватці крові мишей після введення. ВЕРХ дослідження проводили за допомогою колонки C18 з рухомою фазою, що містила 80% метанолу з додаванням 0,1% перхлорної кислоти.

1.4 Існуючі методи дослідження прискореної деградації активних фармацевтичних інгредієнтів

У сучасній практиці дослідження прискореної (стресової) деградації АФІ найчастіше застосовують комбінований набір хімічних, фізичних та фотохімічних підходів, типові умови включають кислотний і лужний гідроліз (різні концентрації HCl та NaOH, варіювання часу і температури), окиснювальні умови (пероксид водню або персульфати), термічний нагрів при підвищених температурах, фотоліз за стандартами ICH Q1B, а також іноді відновні або ферментативні умови для певних класів речовин [83, 84].

Перелічені стресові фактори створюють набір деградаційних продуктів, які потім аналізують за допомогою ВЕРХ і ВЕРХ-МС для достовірної ідентифікації та структурної характеристики продукції деградації.

Значний прогрес за останні роки пов'язаний із широким впровадженням ВЕРХ, ВЕРХ-МС та УВЕРХ-МС у дослідження прискореної деградації АФІ. Високороздільна мас-спектрометрія дозволяє не лише фіксувати m/z продуктів деградації, а й отримувати точні маси для визначення елементного складу, ультраструктурні фрагменти для побудови схем фрагментації і, за потреби, автоматизовані пошуки за базами даних для припущень щодо структури, що особливо важливо при виявленні неочікуваних продуктів деградації або продуктів розпаду низької концентрації [85].

У дослідженні Rochani A. та співавторів [86] при деградації лонідаміну показаний типовий експериментальний шлях, в якому науковці піддавали АФІ серії впливу стресових факторів (кислота, луг, окиснювач, температура, УФ), використовували обернено-фазову ВЕРХ для розділення суміші продуктів деградації та переводили фракції або весь хроматографічний потік на МС для визначення мас-спектрів продуктів деградації та їх фрагментів, що дозволило опрацювати ймовірні механізми розпаду.

У роботі Reddy G. та співавторів [87] описано поведінку левосимендану під час деградації відповідно до рекомендацій ІСН. За термічних та фотолітичних умов препарат мав достатню стабільність, а в інших стресових умовах спостерігалися продукти деградації (ПД). Початкову ідентифікацію ПД було проведено за допомогою UPLC-MS та виділення за допомогою системи автоматичного очищення. Для характеристики ПД було проведено різні 1D та 2D ЯМР-експерименти разом із допоміжними даними ІЧ-спектроскопії та мас-спектрометрії високої роздільної здатності. Новий продукт деградації, що спостерігався в кислих умовах, був виділений та охарактеризований як (R,Z) -2(2-(4-(4-аміно-2-метил-4-оксобутаноїл)феніл)гідразоно)-2-ціанооцтова кислота (ПД-1) з молекулярною формулою $C_{14}H_{14}N_4O_4$. Крім того, було виявлено ще два ПД як в основних, так

і в пероксидних умовах, які в основному є зареєстрованими домішками. (*R,E*)-2-аміно-*N'*-(4-(4-метил-6-оксо-1,4,5,6-тетрагідропіридазин-3-іл)феніл)-2-оксоацетогідразоноїлціанід (ПД-2), продукт перетворення ціано в амід, та (*R*)-5-метил-6-феніл-4,5-дигідропіридазин-3(2*H*) (ПД-3), що утворюється в результаті розриву арильного азотного зв'язка бензолзаміщеного диціаногідразину.

У роботі Wróblewski K. та співавторів [88] розглядається прискорена деградація антидепресанту Вортіоксетину (ВОР). У цьому дослідженні АФІ ВОР та таблетки були піддані детальному дослідженню прискореної деградації з використанням кількох деградуючих агентів (кислоти, лугу, води, тепла, світла та окислювальних агентів). Використовуючи розроблений дослідниками метод ВЕРХ зібрані всі необхідні дані для визначення кінетики деградації. Використовували колонку Polar-RP з рухомою фазою, що складається з ацетонітрилу, метанолу, ацетатного буфера з рН 3,5 та додаванням діетиламіну в ізократичному режимі елюювання. Було виявлено, що ВОР є стійким до окислювальних умов та фотолізу, що призводить до кінетичної реакції першого та другого порядку у вищезазначених стресових умовах відповідно. Продукти розкладання (ПР) були ідентифіковані за допомогою рідинної хроматографії високої роздільної здатності в поєднанні з методом електророзпилювальної іонізаційно-квадрупольно-часопротітної мас-спектрометрії. Метод ВЕРХ був успішно застосований для кількісного визначення ВОР у таблетках. Крім того, було проведено прогнозування токсичності ПР *in silico*.

1.5 Існуючі методи дослідження терміну придатності активних фармацевтичних інгредієнтів

Існуючі методи дослідження терміну придатності АФІ [89-93] активно застосовують ВЕРХ або ВЕРХ-МС як основний аналітичний інструмент, які поєднують декілька підходів. Паралельні дослідження в звичайних умовах та

прискорені дослідження стабільності (реальні умови зберігання та підвищена температура), прискорені прогнози підходи (Accelerated Predictive Stability) із кінетичним моделюванням. В усіх вищезначених підходах метод ВЕРХ використовується для кількісного визначення АФІ (аналіз залишкової кількості АФІ/сумарного вмісту домішок), а ВЕРХ-МС для ідентифікації і структурної характеристики продуктів деградації та для дослідження матричних ефектів.

У класичному прискореному підході підвищення температури застосовується для прискорення реакцій розпаду, після чого проби аналізують регулярними інтервалами за допомогою методу ВЕРХ для оцінки втрати кількості АФІ і можливої появи домішок, при цьому ВЕРХ-МС використовується для підтвердження ідентичності утворених продуктів та для виявлення можливих продуктів деградації, які не завжди видно на УФ-детекторі [94, 95].

Останні роки спостерігається часте застосування методів APS (Accelerated Prediction Studies, прискорені дослідження стабільності), де поєднують серію прискорених експериментів при декількох рівнях температури з використанням рівнянь Арреніуса, Вант-Гоффа та статистичних моделей для прогнозування реального терміну придатності [89, 93]. У таких дослідженнях ВЕРХ-МС грає ключову роль для швидкого профілювання стабільності продукту, оскільки дозволяє одночасно відслідковувати основну сполуку і продукти деградації, а також отримувати дані для побудови кінетичних моделей.

Для підвищення інформативності і чутливості багато робіт рекомендують інтегрувати пробообробку (online-SPE, концентрування фракцій) і мультипараметричну оптимізацію аналітичних умов (DoE/AQbD) ще на етапі проектування, що дозволяє зменшити матричне пригнічення МС детекції, підвищити відновлення продуктів деградації і зробити аналітичні методи більш стійкими до умов випробувань [95, 96].

Регуляторний зміст і настанови за останні роки еволюціонують у бік більш науково-обґрунтованих, ризик-орієнтованих схем. Нові й оновлені версії керівних документів закликають до інтеграції DoE/AQbD у планування досліджень стабільності, формалізованого обґрунтування вибору умов прискорених дослідів і прозорого документування критеріїв для аналітичних методів, при цьому ВЕРХ і ВЕРХ-МС лишаються центральними техніками для дослідження стабільності та інтерпретації результатів [96].

У роботі Ghimire P. та співавторів [97] підкреслюється, що головною метою вивчення стабільності є наукове обґрунтування та встановлення терміну придатності лікарського засобу, що гарантує збереження його ефективності, безпеки та якості протягом усього життєвого циклу. Автори розглядають ключові регуляторні вимоги, встановлені міжнародними (ICH, BOO3) та регіональними (ASEAN, FDA) агенціями, які є обов'язковими для реєстрації будь-якого медичного продукту. У статті детально проаналізовано основні типи досліджень стабільності, включаючи довготривалі випробування, прискорені дослідження для прогнозування деградації (зокрема, з використанням рівняння Арреніуса), та тестування утримуваних зразків. Також обговорюються критичні аспекти планування, такі як класифікація кліматичних зон, розробка протоколу, вибір параметрів тестування та методи прогнозування терміну придатності. Дослідження робить висновок, що випробування стабільності є обов'язковим, науково обґрунтованим процесом, необхідним для забезпечення якості та безпеки ліків відповідно до чинних регуляторних норм.

1.6 Існуючі методи визначення ізотонічної концентрації активних фармацевтичних інгредієнтів

Переглядаючи сучасні наукові роботи [98-102] можна дійти до висновку, що в сьогодення популярні методи визначення ізотонічної концентрації АФІ базуються на поєднанні колігативних теоретичних підходів і прямих

експериментальних вимірювань, причому в практиці фармацевтичної розробки й контролю якості найчастіше застосовують декілька основних методів, що взаємодоповнюють один одного. Класичний метод депресії точки замерзання, метод еквіваленту натрій хлориду, метод коригування об'єму для гіпер- чи гіпотонічних розчинів, а також пряма метрологічна оцінка осмолярності за допомогою осмометрів з подальшим перерахунком у показники відповідно до фармакопейних вимог. Загальні принципи та нормативні рекомендації для вибору та застосування цих методів викладені у фармакопейних та методичних документах [103-105], де підкреслюється перевага прямого вимірювання осмолярності для рутинного контролю якості та необхідність узгодження одиниць і референтних умов при порівнянні результатів.

Теоретично-обчислювальні методи, що опираються на колігативні властивості розчинів, використовують значення депресії точки замерзання, які можна представити як адитивні для сумішей розчинених речовин. Значення - 0,52 °C (або еквівалентна осмолярність близько 290-300 мосмоль/кг) застосовується як цільова депресія для розчинів, ізотонічних щодо плазми крові, і на цій основі розраховують, скільки NaCl додати для досягнення цільового значення осмолярності. Табличні значення депресії точки замерзання для 1% розчинів дозволяють швидко виконувати відповідні розрахунки для застосування на фармацевтичному виробництві. Подібні підходи широко описані в методичних публікаціях і навчальній літературі та лишаються популярними у сьогодення [106, 107].

Емпіричні методи вимірювання осмолярності включають три основні підвиди: вимір депресії точки замерзання, вимір зміни парціального тиску пари і метод застосування прямих мембранних осмометрів. Для фармацевтичних розчинів ці методи дають дещо відмінні результати через вплив в'язкості, динамічних властивостей розчину, мікроструктур та летючих компонентів. Порівняльні дослідження показали, що для низьких значень осмолярності обидві непрямі методики (вимір депресії точки замерзання та

зміни парціального тиску) зазвичай часто застосовуються і мають найбільш коректні результати, тоді як для високих концентрацій чи термочутливих, в'язких АФІ вимір зміни парціального тиску та метод застосування прямих мембранних осмометрів можуть дати більш правдоподібні результати. Тому вибір осмометричного методу має базуватися на складі досліджуваної речовини [107, 108].

У рутинній практиці часто комбінують розрахункові методи та методи з застосуванням приладів вимірювання, де розрахункові методи використовують на етапі проектування та для швидкого коригування ізотонічності, а вимір зміни парціального тиску та метод застосування прямих мембранних осмометрів застосовується як контрольна перевірка під час розробки та у виробництві. Окрім того, сучасні дослідження [107] підкреслюють важливість врахування внеску ексципієнтів у осмоляльність, оскільки їхній ефект часто нелінійний і може суттєво відрізнятися між методиками вимірювання. Наявні емпіричні набори даних по осмоляльності поширених ексципієнтів слугують базою для більш точних прогнозів ізотонічності у складних продуктах.

Крім класичних розрахунків і осмометричних методів, у науковій літературі та практиці з'являються альтернативні і модифіковані підходи [109], спрямовані на розв'язання проблем гіпертонічних формулювань або зменшення необхідної кількості додаткових агентів, що впливають на осмоляльність. Такі підходи проходять валідацію порівняно з традиційними методами і можуть бути корисні при специфічних обмеженнях, наприклад, у разі чутливості активної речовини до іонів NaCl.

Регуляторні та якісні настанови наполягають на документованому виборі методу вимірювання і на застосуванні прямих вимірів там, де точність осмоляльних характеристик критична (парентеральні, офтальмологічні розчини) [104, 105].

РЕЗЮМЕ

Опрацювання наукової літератури показало, що сучасна фармацевтична і медична практика володіє широким арсеналом аналітичних підходів, серед яких провідне місце посідають методи ВЕРХ та ВЕРХ-МС, що стали стандартними інструментами для дослідження АФІ, готових лікарських засобів, їх домішок, продуктів деградації та метаболітів у фармацевтичних і біологічних матрицях. Завдяки високій чутливості, селективності та відтворюваності ці методи забезпечують не лише надійний контроль якості, але й поглиблене вивчення фармакокінетики, метаболізму, стабільності та терміну придатності лікарських речовин, включаючи застосування сучасних підходів оптимізації умов аналізу та комплексних схем пробопідготовки.

Особливої уваги заслуговують похідні 1,2,4-тріазолу, які поєднують широкий спектр фармакологічної активності з відносно низькою токсичністю і розглядаються як перспективне гетероциклічне ядро для створення нових АФІ протигрибкової, протипухлинної, протиепілептичної, протизапальної, гербіцидної та іншої дії.

Літературні дані свідчать, що ВЕРХ та ВЕРХ-МС широко й успішно застосовуються як для контролю чистоти та ідентифікації нових 1,2,4-тріазольних похідних, так і для вивчення їх метаболізму, токсикологічного профілю, прискореної деградації та стабільності, а також для кількісного визначення у плазмі крові й інших біологічних рідинах. У той же час узагальнення опублікованих робіт вказує на доцільність подальшої розробки інтегрованих ВЕРХ та ВЕРХ-МС методик, які одночасно охоплюють ідентифікацію домішок, дослідження фармакокінетики, оцінку стабільності та ін. для конкретних представників цього класу сполук, що й визначає актуальність і напрямок проведеного дослідження. Враховуючи перспективність дослідження похідних 1,2,4-тріазолу, доведену високу фармакологічну активність АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, зокрема акто- та стреспротекторну, обраний

напрямок дисертаційної роботи є актуальним завданням фармацевтичної та медичної науки та практики.

РОЗДІЛ 2

ОБЛАДНАННЯ, МЕТОДИ ТА РЕАКТИВИ, ВИКОРИСТАНІ В ПРОЦЕСІ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

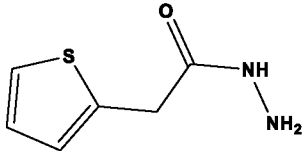
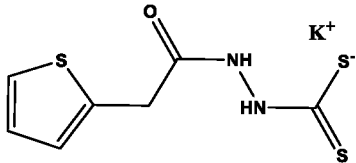
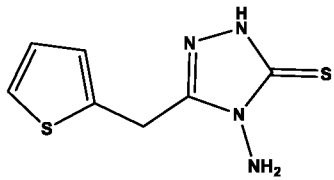
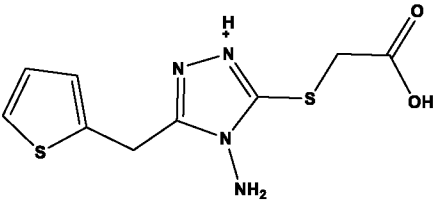
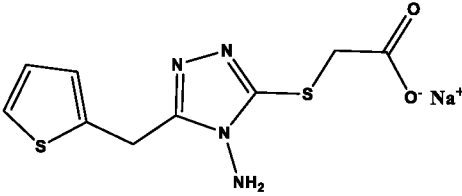
2.1 Об'єкти дослідження

2.1.1 Хімічні сполуки, що використані в синтезі активного фармацевтичного інгредієнту натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

У дослідженні використовувалися субстанції сполук, які були синтезовані на кафедрі токсикологічної та неорганічної хімії (д. фарм. н., доцент Сафонов А.А.) Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, а саме: 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид (табл. 2.1, сполука **2.1**), калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат (табл. 2.1, сполука **2.2**), 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (табл. 2.1, сполука **2.3**), 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)оцтова кислота (табл. 2.1, сполука **2.4**) та натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (табл. 2.1, сполука **2.5**).

Будову та чистоту синтезованих сполук було підтверджено на кафедрі фізикоїдної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету проф. Каплаушенком А. Г. та д. фарм.н. Варинським Б. О. за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричною детекцією, високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричною та, додатково, даними ¹H ЯМР-спектроскопії. Отримані дані стали основою створення «Методів контролю якості» на потенційну субстанцію натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату [110].

Таблиця 2.1 – Характеристика досліджуваних сполук

Сполука	Брутто-формула	Mr, а.о.м.	Структурна формула	Література
2.1	$C_6H_8N_2OS$	156		[110]
2.2	$C_7H_7KN_2OS_3$	270		[110]
2.3	$C_7H_8N_4S_2$	212		[110]
2.4	$C_9H_{11}N_4O_2S_2$	271		[110]
2.5	$C_9H_9N_4NaO_2S_2$	292		[110]

2.1.2 Матеріал біологічного походження

Досліджувані зразки крові щурів, необхідні для аналізу метаболізму та фармакокінетики, були отримані від Навчально-наукового медико-лабораторного центру з віварієм Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (д. фарм. н., професор Щербина Р. О.). Процес збору крові здійснював к. фарм. н., доцент Михайлюк Є. О.

2.2 Обладнання, прилади та програмне забезпечення

Комплекс системи високоефективного рідинного хроматографа з мас-спектрометричною детекцією (рис. 2.1), який складається з: одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6120 з електроспрей-іонізацією (ESI) - модель G6120B Single Quad LCMS («Agilent Technologies», Сінгапур); генератор азоту NiGen LCMS 40-1 («Claind», Італія); дегазатор - модель G4225A 1260 Hrp Degasser («Agilent Technologies», Японія); бінарний насос - модель G1312B 1260 Bin Pump («Agilent Technologies», Німеччина); автосамплер - модель G1329B 1260 ALS («Agilent Technologies», Німеччина); термостат для колонки - модель G1316C 1290 TCC («Agilent Technologies», Німеччина); діодно-матричний детектор - модель G4212B 1260 DAD («Agilent Technologies», Німеччина). Хроматографічні аналітичні колонки з модифікованим силікагелем C18 (октадецилсилікагель) типу Zorbax SB-C18 (30 мм × 4,6 мм, 1,8 мкм). Контроль за процесом відбувається завдяки ліцензійному програмному забезпеченню OpenLab CDS (Chromatography Data System, Agilent Technologies).



Примітки: а – ВЕРХ Agilent 1260 Infinity, б – МС детектор Agilent 6120.
Рисунок 2.1 – Високоєфективний рідинний хроматограф Agilent 1260 Infinity з одноквадрупольним мас-спектрометричним детектором з електроспрей-іонізацією Agilent 6120.

При підготовці зразків для дослідження використовували обладнання: електронні ваги Kern - модель ABT 100-5M («Kern&Sohn GmbH», Німеччина); вихревий взбовтувач ІКА - модель VORTEX Genius 3 («ІКА», Німеччина); ультразвукова ванна Grant - модель XUBA3 («Grant», Великобританія); центрифуга для пробірок типу Епендорф Ulab - модель UC-1512 (ТОВ «ХІМЛАБОРРЕАКТИВ», Україна); система очистки води Direct-Q - модель 3 UV («Millipore», Франція).

Лабораторний посуд для вимірювання об'єму: мірні колби Simax, клас точності «А» (об'єм 100); градуйовані піпетки (об'ємом 1 та 10 мл), що відповідають встановленим межам допустимих похибок для мірного посуду відповідно до вимог ДФУ, Додаток 2 [111]; піпетки-дозатори (діапазони об'єму 10-20 та 10-200 мкл).

Вимірювання температури кристалізації виконано за допомогою термометра Бекмана ТЛ-1 (точність до $\pm 0,005^{\circ}\text{C}$).

При вивченні впливу ультрафіолетового випромінювання застосовували люмінесцентну УФ-лампу YF UV-9W (діапазон довгохвильового ультрафіолету з піком інтенсивності на довжині хвилі 365 нм).

Вимірювання значення рН проводили за допомогою лабораторного іоніметра И160МИ.

Прогноз біотрансформації для пошуку метаболітів проводився за допомогою безкоштовного програмного забезпечення для передбачення метаболізму малих молекул в організмі людини і не тільки (організм тварин, мікробіомі кишечника, навколишнє середовище) BioTransformer 3.0 [112].

Деконволюція значень m/z була проведена за допомогою програмного забезпечення для обробки, аналізу та візуалізації мас-спектрометричних даних MZmine 3.0 [113].

Для комплексного аналізу метаболомічних даних (статистична обробка, хемометричний аналіз, візуалізація великих мас-спектрометричних даних і т.п) використовували сучасний онлайн-сервіс MetaboAnalyst 6.0 [114].

2.3 Хімічні реактиви та розчинники. Виготовлення та підготовка робочих розчинів

Ацетонітрил (CH_3CN) для ВЕРХ класифікації Super Gradient («Avantor Performance Materials Poland S.A.», Польща); мурашина кислота (HCOOH) класифікації «For analysis» (98%) («AppliChem GmbH», Німеччина); 3% розчин перекису водню (H_2O_2) («PC VIOLA LLC», Україна), 0.1 М розчин NaOH , 0.1 М розчин HCl , високоочищена вода (Q_3 , 18 $\text{M}\Omega$, 25 $^{\circ}\text{C}$).

При підтвердженні молекулярної маси та будови, дослідженні характеристик хроматографічного утримання в залежності від концентрації ацетонітрилу, визначенню показників залежності від температури та аналізу

мас-спектрометричної фрагментації готували водні розчини речовин **2.1-2.5** із концентрацією 1 мг/мл.

2.4 Основні законодавчі та нормативні документи

Основними нормативно-правовими документами, на які спирається дане дослідження, є національні та міжнародні фармакопеї, а також офіційні керівництва з валідації аналітичних і біоаналітичних методик. Зокрема, Державна Фармакопея України (першого та другого видань) [103, 115-121], Європейська Фармакопея (11 видання) [104]. Додатковим нормативним підґрунтям є керівництво Управління з контролю за продуктами і ліками США (FDA) з валідації біоаналітичних методів [122], крім того, враховано вимоги Європейської агенції з лікарських засобів (EMA) щодо валідації біоаналітичних методик [123], які узгоджені з принципами належної лабораторної практики (GLP) і гармонізовані з міжнародними стандартами ІСН. Ці положення адаптовані у вітчизняних методичних рекомендаціях [124], що забезпечує відповідність національних підходів до контролю якості та аналітичних процедур міжнародним вимогам.

2.5 Розрахункові формули

Всі використані розрахункові формули у контексті дисертаційної роботи надаються по тексту роботи у відповідних розділах та підрозділах.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ НАТРІЙ 2-((4-АМІНО-5-ТІОФЕН-2-ІЛМЕТИЛ)-4*H*-1,2,4-ТРІАЗОЛ-3- ІЛ)ТІО)АЦЕТАТУ, ДОСЛІДЖЕННЯ ПАРАМЕТРІВ МАС- СПЕКТРОМЕТРИЧНОГО ДЕТЕКТУВАННЯ

3.1 Підтвердження молекулярної маси та будови натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок методом ВЕРХ-МС

У цьому підрозділі представлені результати аналізу за допомогою рідинної хроматографії, що спрямовані на підтвердження молекулярної маси та будови АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, а також супутніх домішок, що можуть утворюватись на етапі синтезу. Ідентифікацію сполук здійснено за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням, що дозволило встановити хроматографічні піки утримування, які відповідають квазімолекулярним іонам та характерним фрагментаційним патернам. Отримані дані, включно зі схемою синтезу натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, використано для підтвердження структури досліджуваних речовин, зокрема з урахуванням можливих процесів димеризації, ізомеризації та розщеплення, в тому числі функціональних груп у процесі іонізації під дією електроспрея в джерелі мас-спектрометра.

3.1.1 Параметри виконання хроматографічного дослідження

На першому етапі, для проведення хроматографічного визначення натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок, що можуть утворюватися на етапі отримання, а саме, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-

карбодіонату, а також 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону, використовували колонку діаметром 4,6 мм. і довжиною 30 мм., заповнену сорбентом Zorbax SB-C18 з розміром часток 1,8 мкм.

Аналіз проводили за допомогою високоефективної рідинної хроматографічної системи з мас-спектрометричним детектуванням на обладнанні Agilent 1260 Infinity HPLC System, що включає дегазатор, бінарний насос, автосамплер, термостат для колонки та діодно-матричний детектор. Визначення молекулярної маси здійснювали за допомогою одноквадрупольного мас-спектрометра з електроспрейною іонізацією Agilent 6120. Управління процесом аналізу та обробку даних виконували за допомогою ліцензійного програмного забезпечення Agilent OpenLAB Software CDS.

Для підтвердження молекулярної маси АФІ та супутніх домішок використовували плавну зміну співвідношення рухомої фази:

- Фаза А – вода (H₂O) з додаванням 0,1% мурашиної кислоти (HCOOH).
- Фаза Б – ацетонітрил (CH₃CN) з додаванням 0,1% мурашиної кислоти (HCOOH).

Детальні параметри градієнта наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Тестові умови складу елюенту при першочерговому визначенні молекулярної маси АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок

Час (хв.)	CH ₃ CN (%)	Швидкість потоку (мл/хв)
0	0	0.400
10	100	0.400

Процес та умови виготовлення розчинів досліджуваних сполук та робочих розчинів описані в підрозділі 2.3.

В процесі дослідження діодно-матричний детектор працював на довжинах хвиль 210, 254 нм, що є стандартними в умовах експерименту, в тому числі за участю ароматичних фрагментів. Для точного визначення молекулярної маси досліджуваних сполук ідентифікацію здійснювали шляхом аналізу значень «маси до заряду» m/z . Мас-спектрометричний детектор здійснював сканування в максимально можливому діапазоні 50-1000 m/z , що дозволяло реєструвати широкий спектр іонів із різною молекулярною масою. Напруга на фрагменторі була встановлена на рівні 70 В як у позитивному, так і в негативному режимах іонізації.

3.1.2 Хроматографічне підтвердження молекулярної маси АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок

Синтез натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату [110, 125] (сполука **5**, рис. 3.1) включає проміжні продукти, такі як 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид (сполука **1**, рис. 3.1), калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат (сполука **2**, рис. 3.1), 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (сполука **3**, рис. 3.1), що є потенційними технологічними домішками. 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)оцтова кислота (сполука **4**, рис. 3.1) входить до структури її відповідної натрієвої солі, отже домішкою вважатися не може.

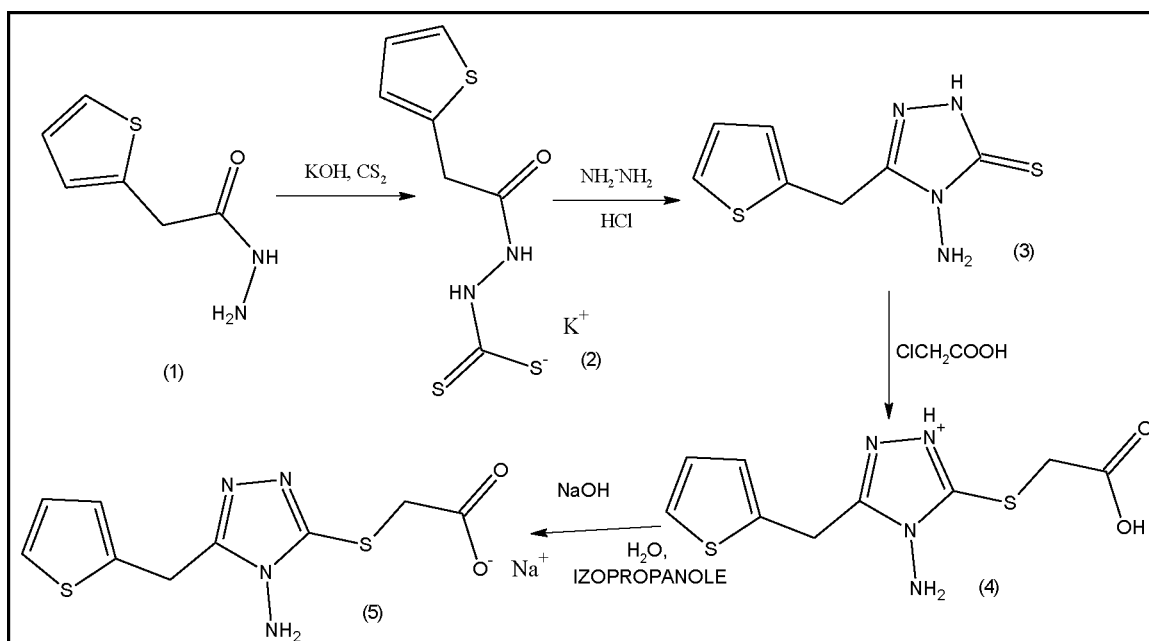


Рисунок 3.1 – Схема синтезу натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

Кожен проміжний продукт синтезу було ідентифіковано та підтверджено за допомогою високоефективної рідинної хроматографії в поєднанні з мас-спектрометричним детектуванням. Під час аналізу використовували об'єм інжекції 5 мкл, що забезпечувало достатню концентрацію зразка для чутливого та точного визначення його складу.

2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид – хроматограма, отримана за допомогою діодно-матричного детектора при довжині хвилі 254 нм, представлена на рис 3.2. Значення m/z 157 відповідає квазімолекулярному протонованому йону 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду ($[M+H]^+$). Отриманий сигнал на спектрі мас-детектора підтверджує наявність досліджуваної сполуки та дозволяє використовувати його для подальших досліджень (рис. 3.3).

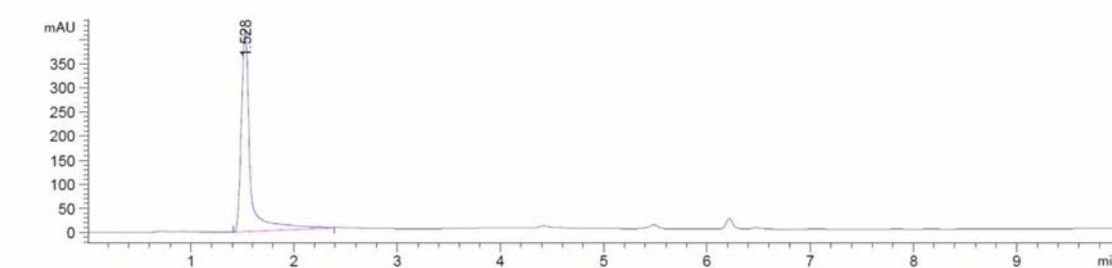


Рисунок 3.2 – Хроматограма 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду при довжині хвилі діодно-матричного детектора 254 нм.

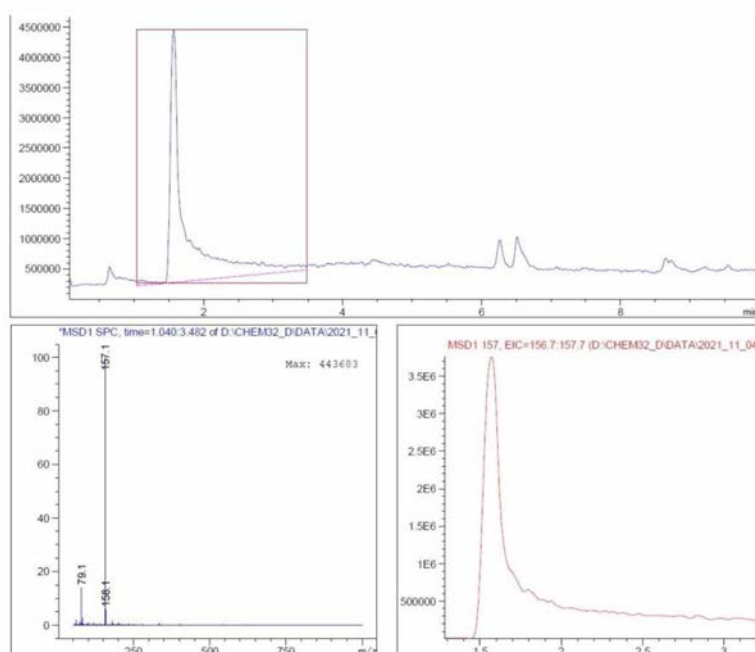


Рисунок 3.3 – Хроматограма 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду в режимі позитивної іонізації при загальній інтенсивності іонного струму, мас-спектр та іонна хроматограма за виділеним сигналом при m/z 157.

Калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат — хроматограма, отримана за допомогою діодно-матричного детектора при довжині хвилі 254 нм, представлена на рис 3.4. На виділеному сигналі (рис. 3.5) хроматограми максимальна інтенсивність піку відповідає значенню m/z 199. Дана m/z утворюється внаслідок фрагментації квазімолекулярного катіону 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонатної кислоти шляхом втрати двох протонів ($2H^+$) і атома сірки (S). Процес розщеплення можна відобразити рівнянням масового балансу: $233 - (2 + 32) = 199$ ($[M - (2H^+ + S)]$).

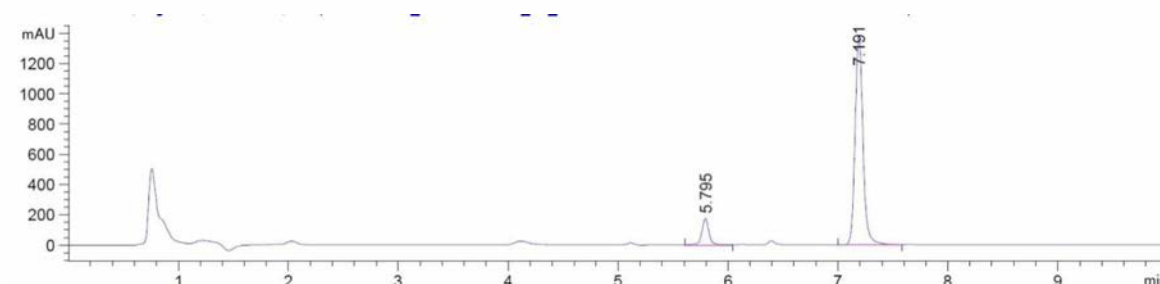


Рисунок 3.4 – Хроматограма калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату при довжині хвилі діодно-матричного детектора 254 нм.

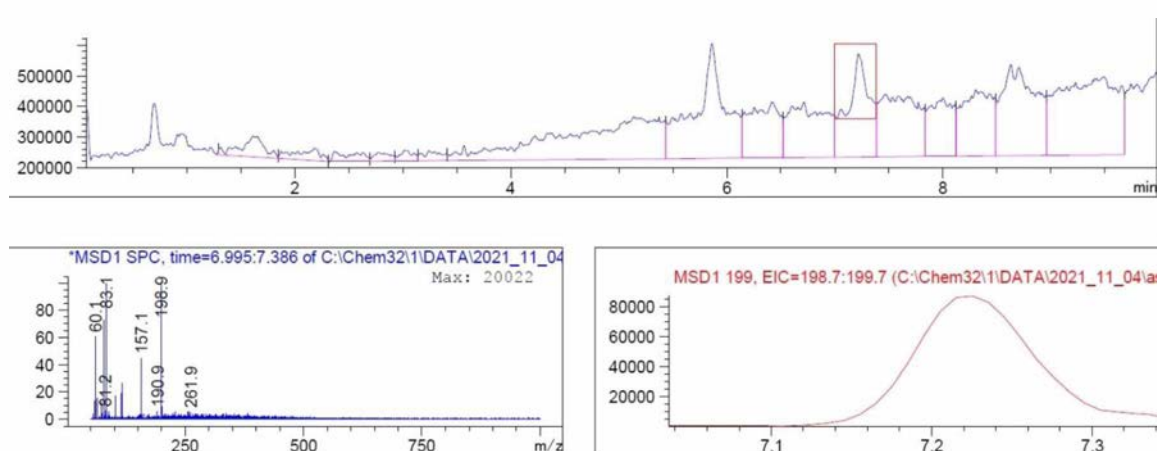


Рисунок 3.5 – Хроматограма калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату в режимі позитивної іонізації при загальній інтенсивності іонного струму, мас-спектр та іонна хроматограма за виділеним сигналом при m/z 199.

Отримані результати визначення калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату в режимі негативної іонізації збігаються з даними, отриманими при позитивній іонізації. У мас-спектрі, записаному в негативному режимі, виявлено іон із m/z 197, що вказує на утворення сполуки, яка утворюється внаслідок відщеплення чотирьох протонів ($4H^+$) і атома сірки (S) від квазімолекулярного іону 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонатної кислоти. Процес розщеплення можна відобразити рівнянням масового балансу: $233 - (4 + 32) = 197$ ($[M - (4H^+ + S)]$). Це свідчить про

аналогічну закономірність фрагментації молекули в обох режимах іонізації, що підтверджується мас-спектрометричними даними, наведеними на рис. 3.6

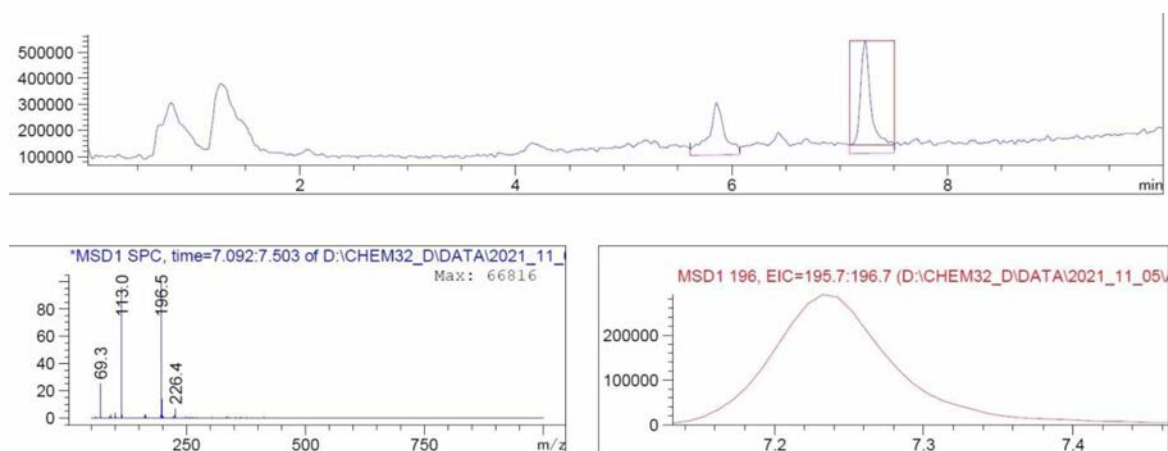


Рисунок 3.6 – Хроматограма калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату в режимі негативної іонізації при загальній інтенсивності іонного струму, мас-спектр та іонна хроматограма за виділеним сигналом при m/z 197.

В іонному джерелі електророзпилення відбувається процес іонізації молекул аналіту, після чого вони надходять у капіляр та проходять розподіл у квадрупольному аналізаторі за відношенням m/z у позитивному або негативному режимі. Умови утворення як позитивних, так і негативних іонів є однаковими, а різниця полягає лише у способі їх поділу в іонній оптиці. Утворена в іонізаційній камері сполука може набувати структури ізотіоціанату внаслідок втрати 34 а. о. м. від 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату. Ця трансформація пояснюється елімінацією H_2S або відщепленням 2H^+ та атома сірки (S), що є наслідком деградації карбодіонату [126]. Процес трансформації карбодіонату відбувається на зарядженому електроді в іонізаційній камері електророзпилювача, або за високої температури в присутності кисню, оскільки температура газу осушувача у системі становить $300\text{ }^\circ\text{C}$ (рис 3.7).

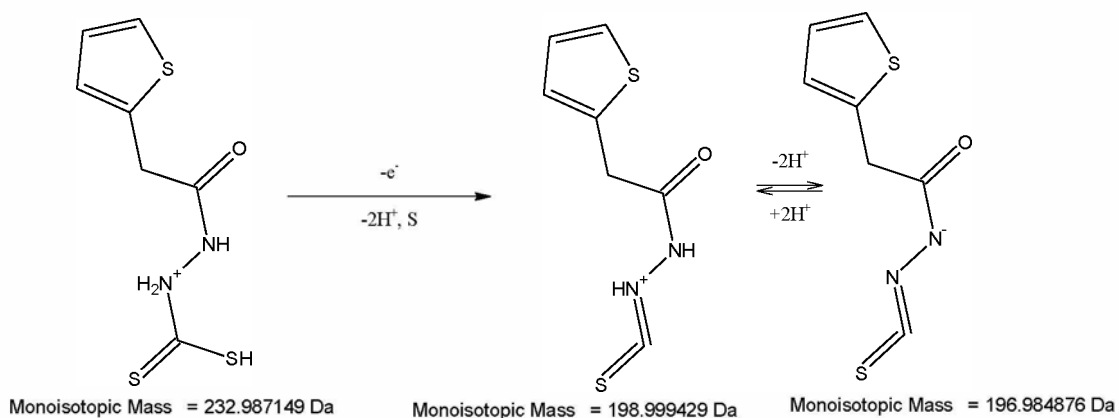


Рисунок 3.7 – Схема процесу трансформації 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразін-1-карбодіонатної кислоти.

4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон — хроматограма, отримана з використанням діодно-матричного детектора при довжині хвилі 254 нм, представлена на рис 3.8. Значення m/z 213 на мас-спектрі (рис. 3.9) відповідає квазімолекулярному йону 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону ($[M+H]^+$).

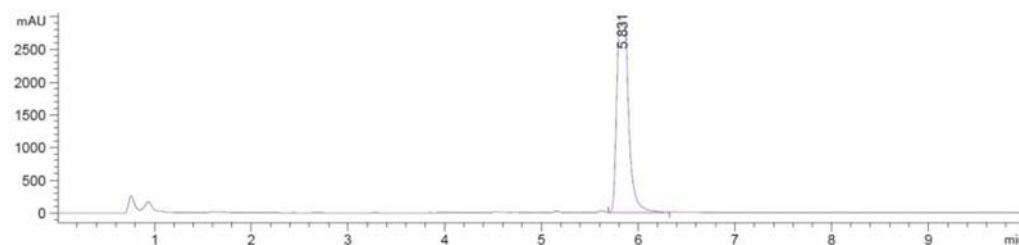


Рисунок 3.8 – Хроматограма 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону при довжині хвилі діодно-матричного детектора 254 нм.

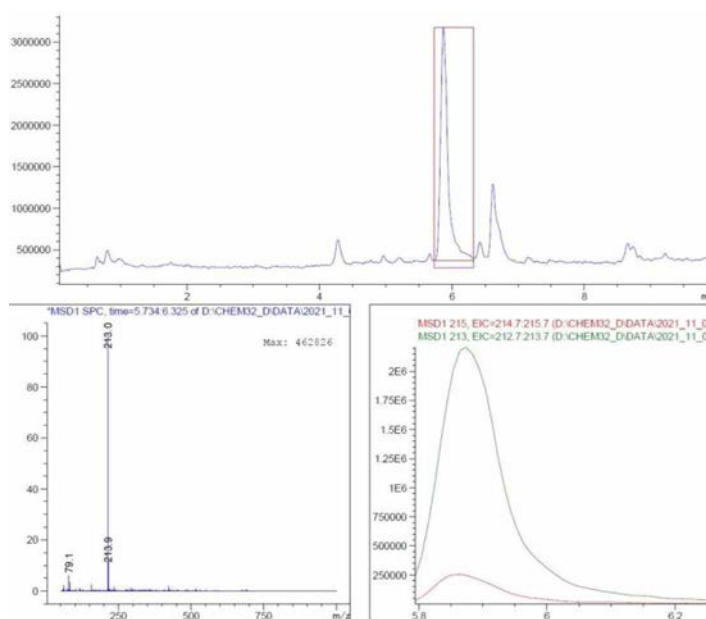


Рисунок 3.9 – Хроматограма 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону в режимі позитивної іонізації при загальній інтенсивності іонного струму, мас-спектр та іонна хроматограма за виділеним сигналом при m/z 213 і 215.

Натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат – хроматограма, отримана за допомогою діодно-матричного детектора при довжині хвилі 254 нм, представлена на рис 3.10. Значення m/z 271 на мас-спектрі (рис. 3.11) відповідає квазімолекулярному йону 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату ($[M+H]^+$). Додатковим доказом утворення цільової сполуки є наявність катіону з m/z 541, який відповідає квазімолекулярному димерному йону 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Таким чином, наявність димерного йону в мас-спектрі підтверджує, що молекули аналіту можуть утворювати асоціати під час іонізації, а мас-спектрометр здатний реєструвати ці утворення, що додатково підтверджує склад та структуру досліджуваної речовини.

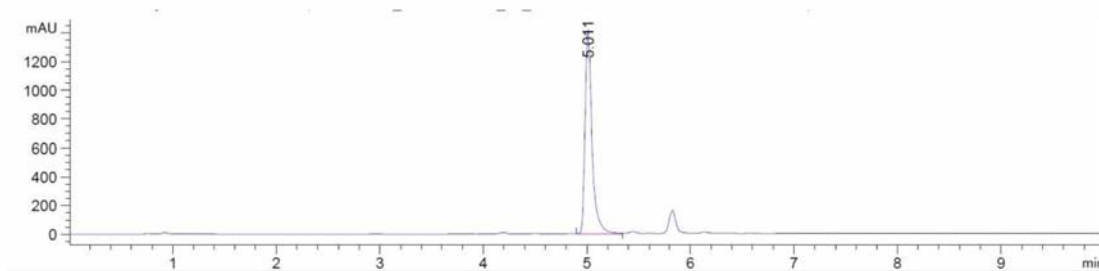


Рисунок 3.10 – Хроматограма натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при довжині хвилі діодно-матричного детектора 254 нм.

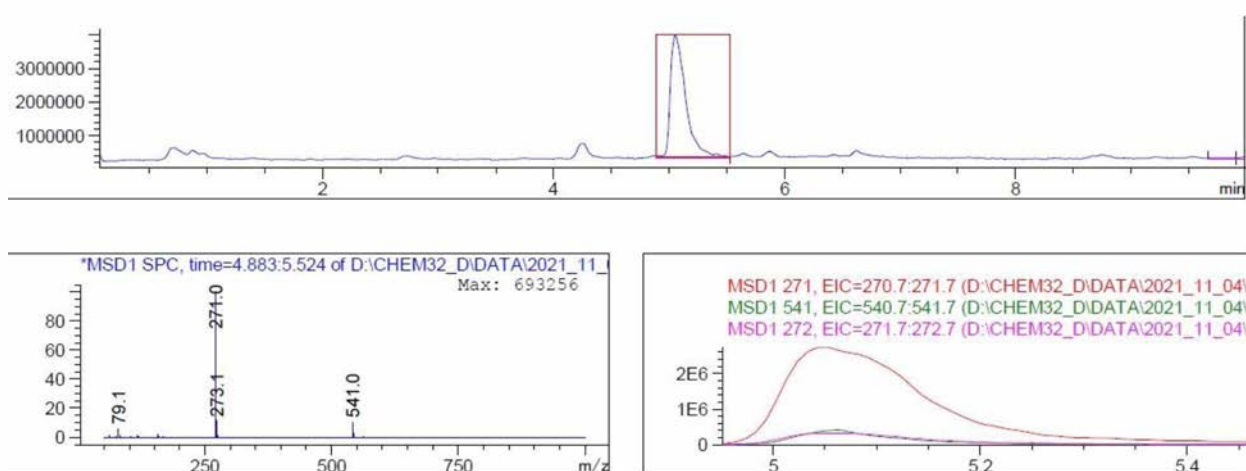


Рисунок 3.11 – Хроматограма натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в режимі позитивної іонізації при загальній інтенсивності іонного струму, мас-спектр та іонна хроматограма за виділеним сигналом при m/z 271, 272 і 541.

3.2 Дослідження характеристик хроматографічного утримання досліджуваних сполук від вмісту ацетонітрилу

Для визначення оптимальних умов хроматографічного визначення натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, в тому числі за одночасної присутності, супутніх домішок, що можуть утворюватися разом із цільовим продуктом під час синтезу, необхідно дослідити вплив вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі, оскільки він є ключовим

параметром, що визначає ефективність і якість розділення сполук під час хроматографування.

3.2.1 Параметри виконання хроматографічного дослідження залежності АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі

Параметри приготування розчинів досліджуваних сполук описані у підрозділі 2.3. Хроматографічний аналіз виконували в ізократичному режимі, використовуючи як рухому фазу H_2O з додаванням 0,1% HCOOH (буферний розчин) та CH_3CN з 0,1% HCOOH (органічний модифікатор) в одинадцяти різних співвідношеннях: 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 та 100% об'єму органічного модифікатора до буферного розчину. Для розділення застосовували колонку Zorbax SB-C18 (30 мм $\times$ 4,6 мм, 1,8 мкм) при робочій температурі 40°C. Швидкість потоку елюенту підтримували на рівні 0,4 мл/хв. Об'єм інжекції 2 мкл. Іонізацію здійснювали методом електроспрею (ESI) у режимі SIM (реєстрація вибраних іонів), відповідно до m/z досліджуваних сполук, як зазначено у підрозділі 3.1.2. При роботі мас-детектора в режимі позитивної полярності, напруга на фрагменторі була встановлена на рівні 70 В. Швидкість потоку газу-осушувача (азоту) становила 10 л/хв. В процесі хроматографічного дослідження діодно-матричний детектор працював на довжинах хвиль 232, 234, 246 та 260 нм (табл. 3.2), які визначені як найоптимальніші відповідно від отриманих результатів довжин хвиль за яких спостерігалось максимальне поглинання світла досліджуваних сполук в процесі проведення експерименту, описаного в підрозділі 3.1.2.

Таблиця 3.2 – Максимуми поглинання світла АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його супутніх домішок

№	Сполука	Максимальне поглинання світла. нм
1.	2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид 2.1	234
2.	калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат 2.2	260
3.	4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-тіон 2.3	246
4.	натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат 2.5	232

Спектри поглинання досліджуваних сполук наведені на рисунку 3.12.

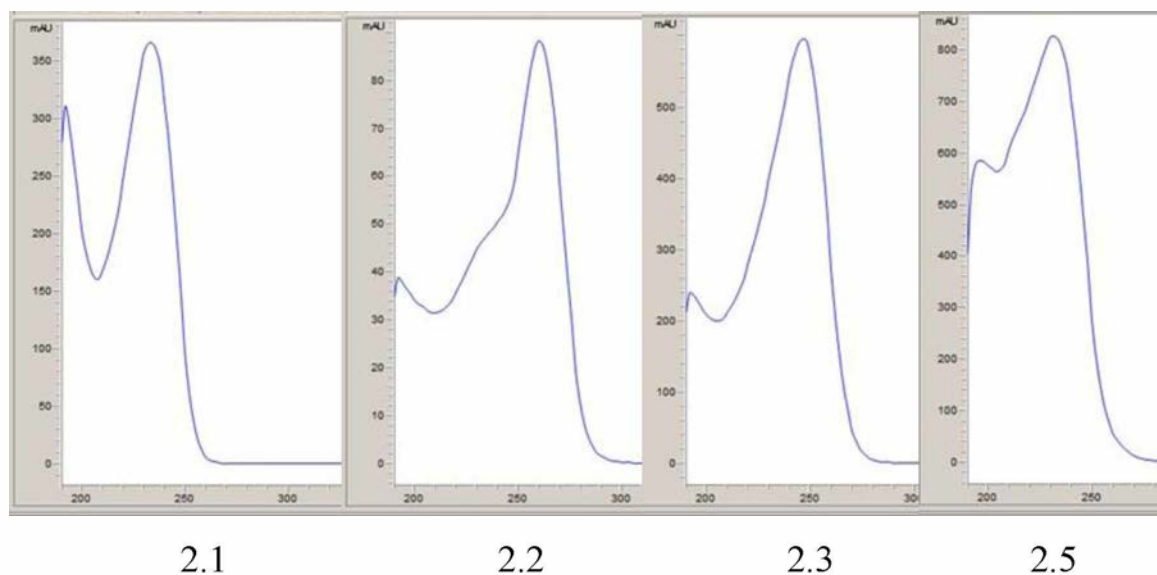


Рисунок 3.12 – УФ-спектри 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2**, 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3**, натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**.

3.2.2 Дослідження залежності хроматографічного утримання сполук від вмісту ацетонітрилу

Для встановлення оптимального складу елюенту для визначення досліджуваних сполук було проведено дослідження залежності часу утримання від вмісту ацетонітрилу при його співвідношенні 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 та 100% об'єму як для основної речовини АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** (рис. 3.13-3.15), так і для кожної потенційної технологічної домішки: 2-(тіофен-2-іл)ацетогідазиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідазин-1-карбодіонату **2.2**, 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3**.

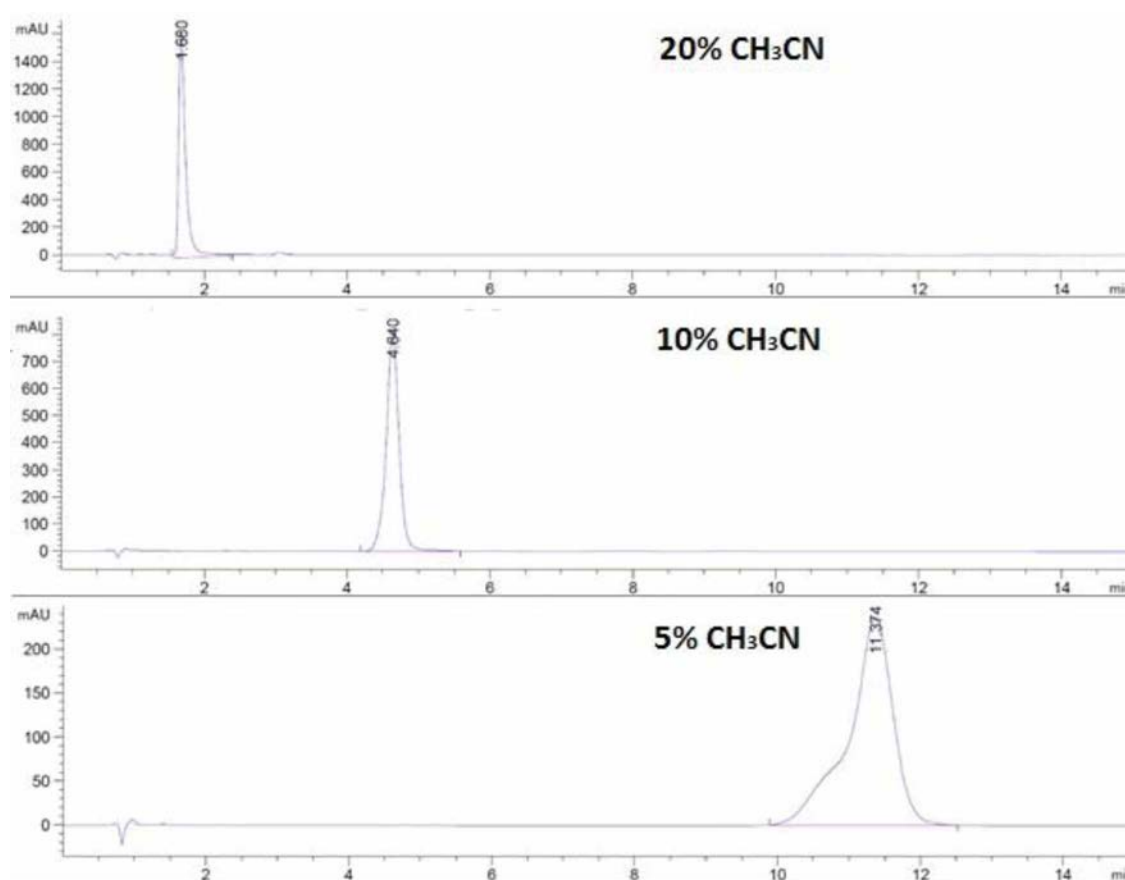


Рисунок 3.13 – Вплив вмісту ацетонітрилу (від 5 до 20%) на показники хроматографічного піку АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

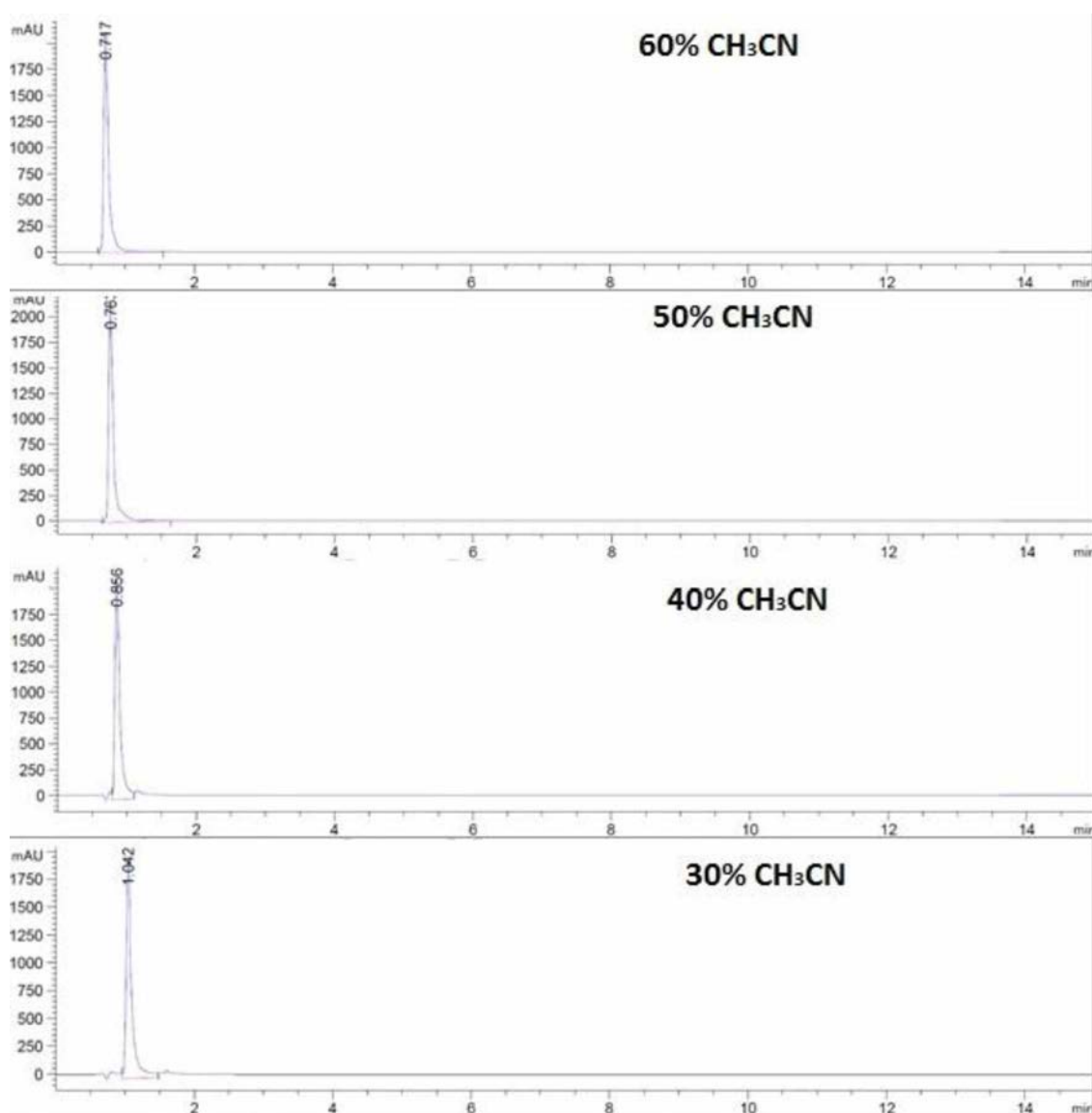


Рисунок 3.14 – Вплив вмісту ацетонітрилу (від 30 до 60%) на показники хроматографічного піку АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

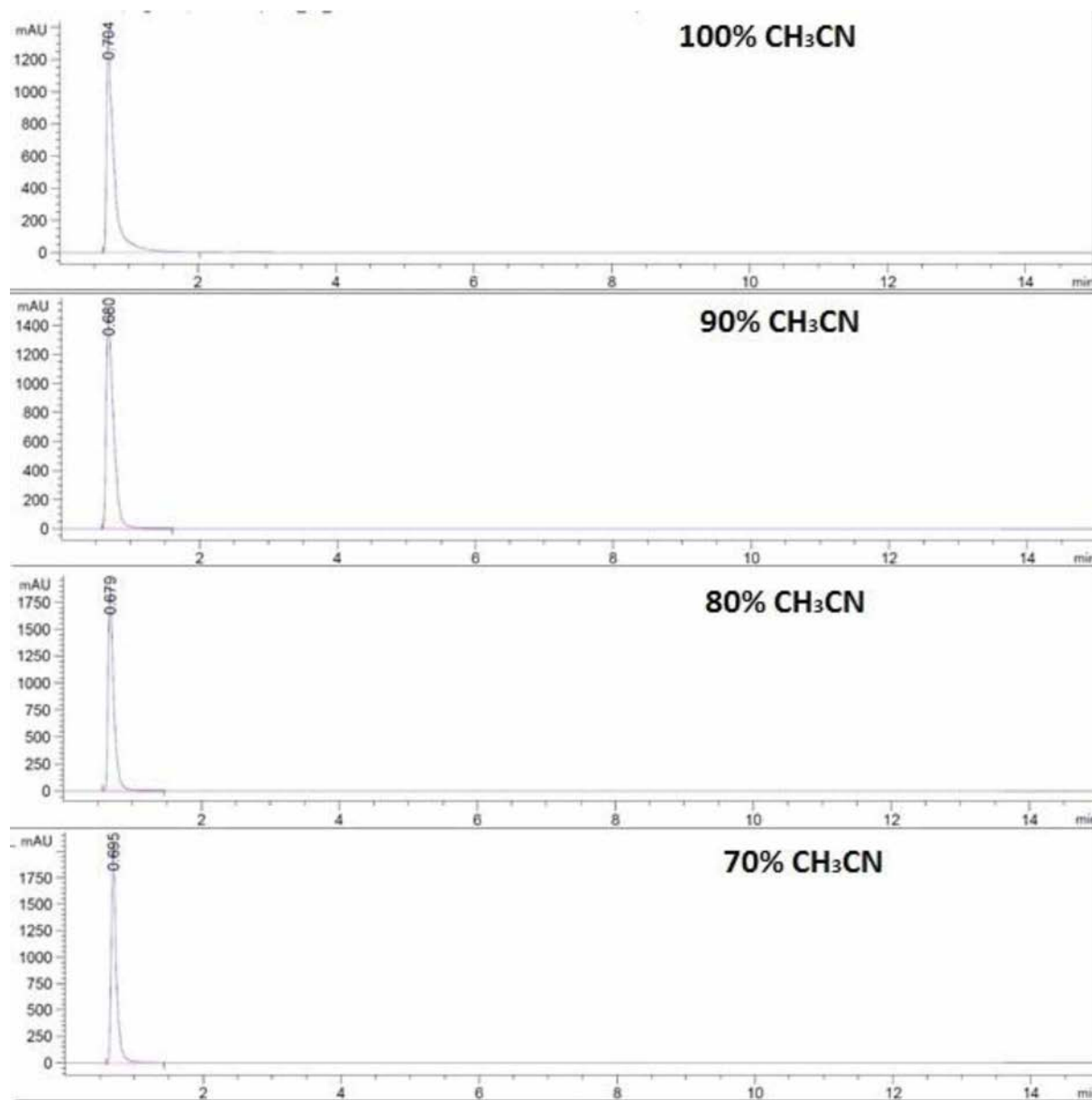


Рисунок 3.15 – Вплив вмісту ацетонітрилу (від 70 до 100%) на показники хроматографічного піку АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

Для встановлення оптимальних хроматографічних умов для визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3** при дослідженні взаємозв'язку між часом утримування та вмістом ацетонітрилу в рухомій фазі побудовано графіки залежності

коефіцієнта ємності k від концентрації ацетонітрилу в звичайних координатах (рис. 3.16) та логарифмічних $\lg k$ (рис. 3.17).

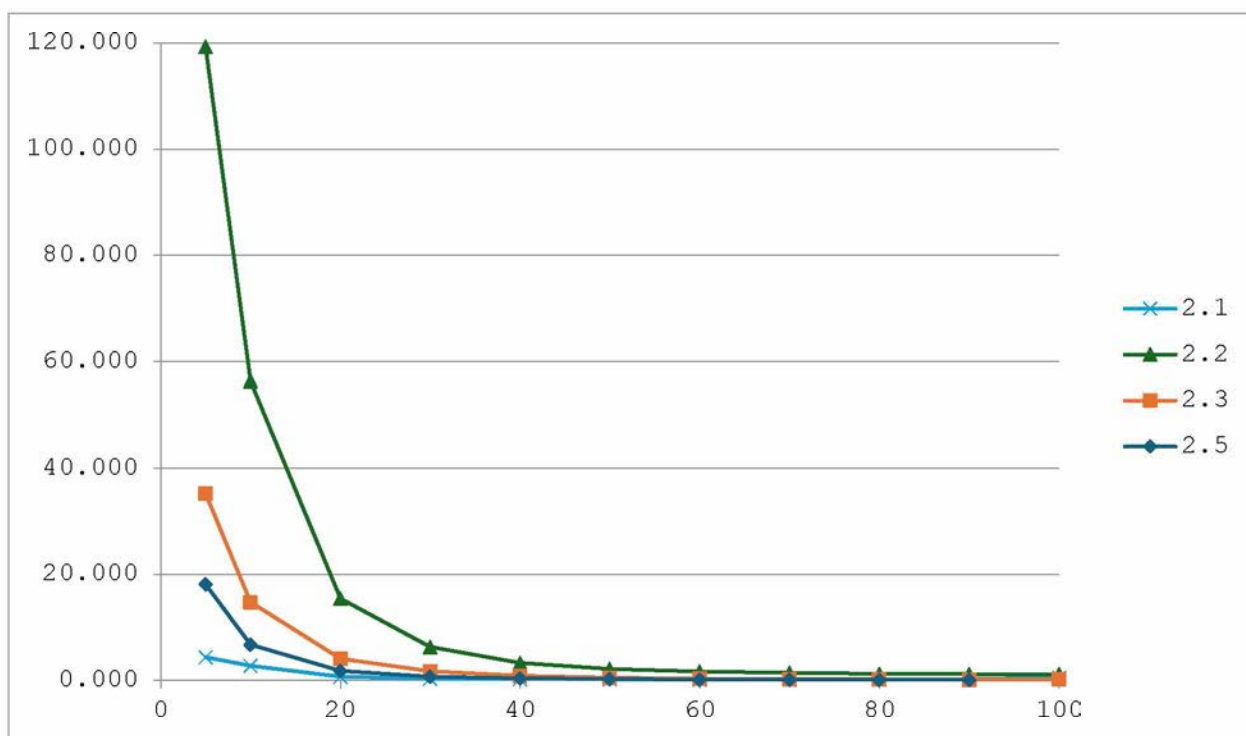


Рисунок 3.16 – Графік залежності коефіцієнта ємності від концентрації ацетонітрилу для АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3**.

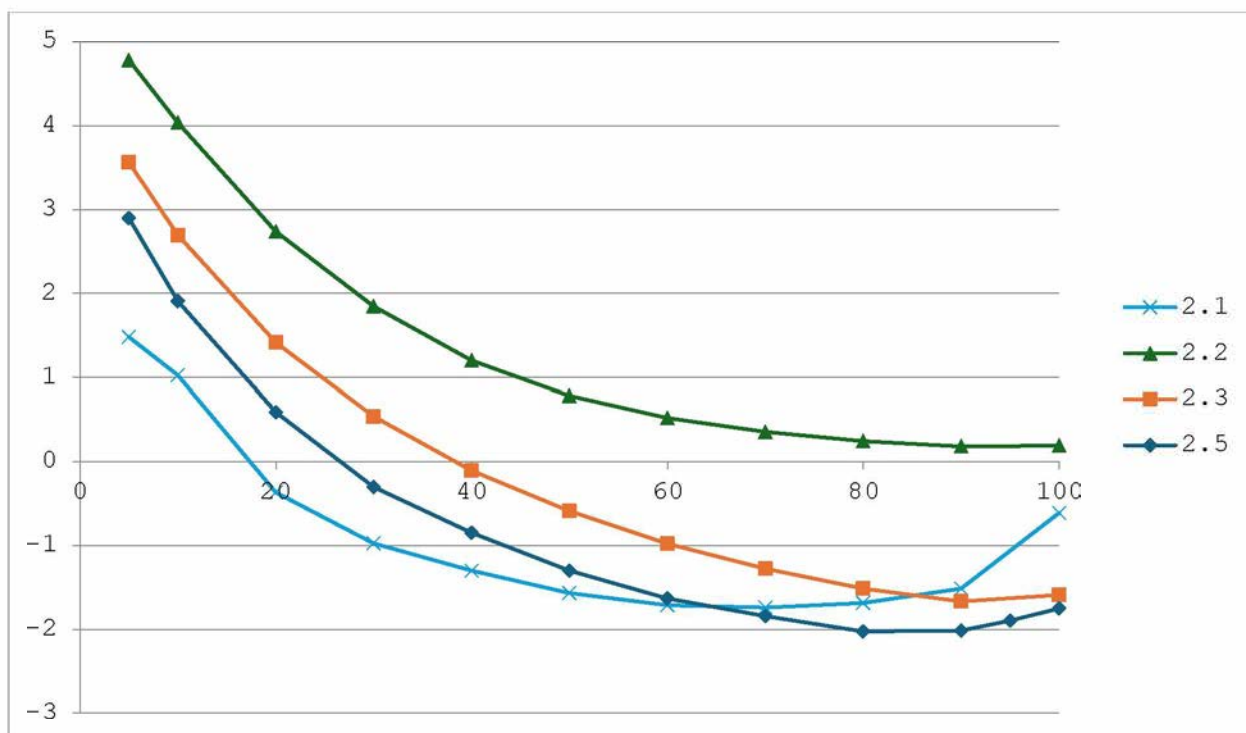


Рисунок 3.17 – Графік залежності логарифма коефіцієнта ємності від концентрації ацетонітрилу для АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3**.

Аналізуючи рис. 3.16 та 3.17 ми робимо висновок, що оптимальне утримання та розділення всіх досліджуваних сполук спостерігається при 20-30% об'єму ацетонітрилу, але для більш точного встановлення оптимальних умов визначені характеристики утримування, вибірковості, асиметрії та ефективності на цільових 20, 25 і 30%. Результати наведені в таблицях 3.3-3.6 відповідно.

У монографії P.J. Schoenmakers зазначено, що оптимальне значення коефіцієнта утримання знаходиться в межах $1 < k < 10$ [127]. Згідно з таблицею 3.3, при 20% ацетонітрилу для калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** $k > 10$, збільшення концентрації до 25% приводить цей показник до прийнятного значення (8,872), але коефіцієнт ємності для 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1** в усіх випадках менше одиниці.

Таблиця 3.3 – Показники фактору коефіцієнту ємності АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його супутніх домішок при 20, 25 та 30% об'єму ацетонітрилу

№	Речовина	Фактор коефіцієнту ємності, <i>k</i>		
		20%	25%	30%
1.	2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид 2.1	0.705	0.533	0.368
2.	калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат 2.2	15.420	8.872	6.311
3.	4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-тіон 2.3	4.100	2.367	1.712
4.	натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат 2.5	1.800	1.050	0.737

Якість поділу на хроматографічній колонці визначається Європейською Фармакопеею [128]. Відповідно до рекомендацій Ph. Eur. 6th Edition, 2008, роздільна здатність вважається розділенням базової лінії, якщо вона >1.5. При 25% ацетонітрилу для речовин **2.2**, **2.3**, **2.5**, показник роздільної здатності має достатнє значення і лише незначно меншим є для сполуки **2.1** (табл. 3.4). Збільшення вмісту ацетонітрилу до 30% приводить до значного зниження вмісту 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1** і АФІ **2.5** та значно погіршує розділення.

Таблиця 3.4 – Показники роздільної здатності АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його супутніх домішок при 20, 25 та 30% об'єму ацетонітрилу

№	Речовина	Роздільна здатність, R_s		
		20%	25%	30%
1.	2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид 2.1	2.16	1.39	0.76
2.	калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат 2.2	10.18	9.23	9.34
3.	4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-тіон 2.3	7.34	5.42	4.07
4.	натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат 2.5	4.08	2.44	1.44

Ще одним важливим чинником, що впливає на якість вимірювання площі піку та його відтворюваність, є асиметрія піку. Отримані результати свідчать про те, що 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид **2.1** демонструє значну асиметрію піку (табл. 3.5). Асиметрія піку може бути зумовлена наявністю відкритих силанольних груп сорбенту (у даному випадку неендекопійованих SB), з якими можуть взаємодіяти азотовмісні протоновані основи. Згідно з рекомендаціями [129], коефіцієнт симетрії (так званий коефіцієнт «хвоста» піку) не повинен перевищувати 2.

Можна підвести проміжний підсумок та зазначити, що на основі аналізу фактору показників коефіцієнту ємності, роздільної здатності та симетрії, концентрація ацетонітрилу у 20% є менш прийнятною за 25 та 30%. Зазначені показники для 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1** незначно, але є малоприйнятними, при цьому в першу чергу ми орієнтувалися на перелічені значення для АФІ та інших потенційних домішок.

Таблиця 3.5 – Показники асиметрії АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його супутніх домішок при 20, 25 та 30% об'єму ацетонітрилу

№	Речовина	USP фактор «хвоста», Т		
		20%	25%	30%
1.	2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид 2.1	3.407	2.241	1.050
2.	калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат 2.2	0.792	0.829	0.940
3.	4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-тіон 2.3	1.091	1.310	1.396
4.	натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат 2.5	2.169	2.006	2.056

Остаточним аргументом на користь вибору концентрації ацетонітрилу на рівні 25% є той факт, що подальше підвищення його вмісту до 30% приводить до суттєвого зниження ефективності розділення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**. Як видно з даних, наведених у таблиці 3.6, при концентрації ацетонітрилу 30% спостерігається зниження показників ефективності колонки.

Таблиця 3.6 – Показники ефективності хроматографічної колонки під час дослідження АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його супутніх домішок при 20, 25 та 30% об'єму ацетонітрилу

№	Речовина	Кількість теоретичних тарілок, N		
		20%	25%	30%
1.	2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид 2.1	1415	1220	1111
2.	калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат 2.2	1207	1139	1934
3.	4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-тіон 2.3	3372	3253	2280
4.	натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат 2.5	1315	1098	937

Таким чином остаточний вибір відсоткового вмісту ацетонітрилу в складі рухомої фази для визначення АФІ в присутності домішок залишається на значенні в 25% об'єму, саме при цій концентрації забезпечується найкраще розділення досліджуваних сполук та стабільність піків. Для визначення АФІ без врахування домішок рекомендовано використовувати 20% об'єму ацетонітрилу.

Для покращення хроматографічних параметрів, зокрема зменшення часу утримування, впроваджено градієнтну зміну швидкості потоку елюентів. Відповідні параметри градієнту наведені у таблиці 3.7.

Таблиця 3.7 – Умови градієнтної швидкості потоку при ВЕРХ визначенні АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок

Час (хв.)	Швидкість потоку (мл/хв)
0	0.400
2.6	0.400
2.7	2.000
4	2.000

Фінальні результати хроматографії в оптимізованих умовах представлені на рисунку 3.18. Показники роздільної здатності (R_s), симетрії (T) та ефективності хроматографічної колонки (N) під час хроматографування АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідазиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3**, наведені в таблиці 3.8.

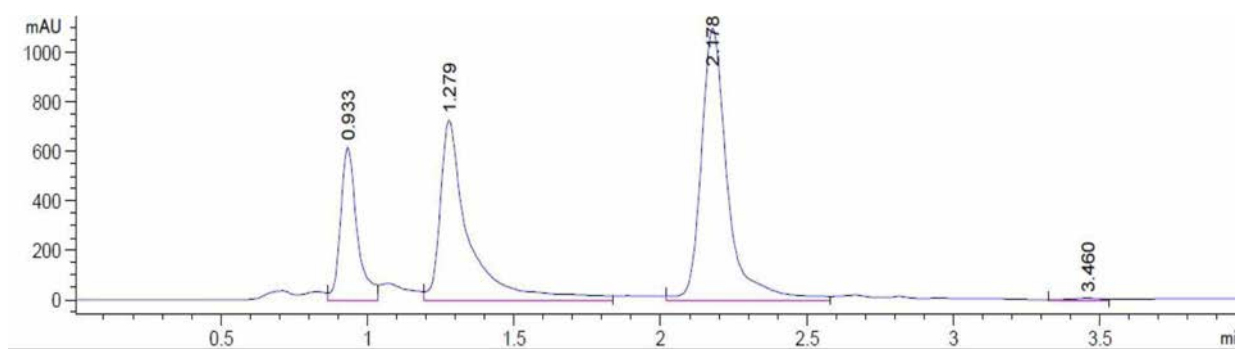


Рисунок 3.18 – Хроматограма суміші 1 мг/мл АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідазиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3** при оптимальних умовах.

Таблиця 3.8 – Показники роздільної здатності (R_s), асиметрії (Т) та ефективності хроматографічної колонки (N) під час хроматографування суміші 1 мг/мл АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідазиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3**

№	Речовина	R_s	Т	N
1.	2-(тіофен-2-іл)ацетогідазид 2.1	1.37	2.038	1281
2.	калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат 2.2	9.41	0.798	1162
3.	4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон 2.3	6.53	1.379	3278
4.	натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат 2.5	3.07	1.987	1142

3.3 Дослідження характеристик хроматографічного утримання досліджуваних сполук від температури

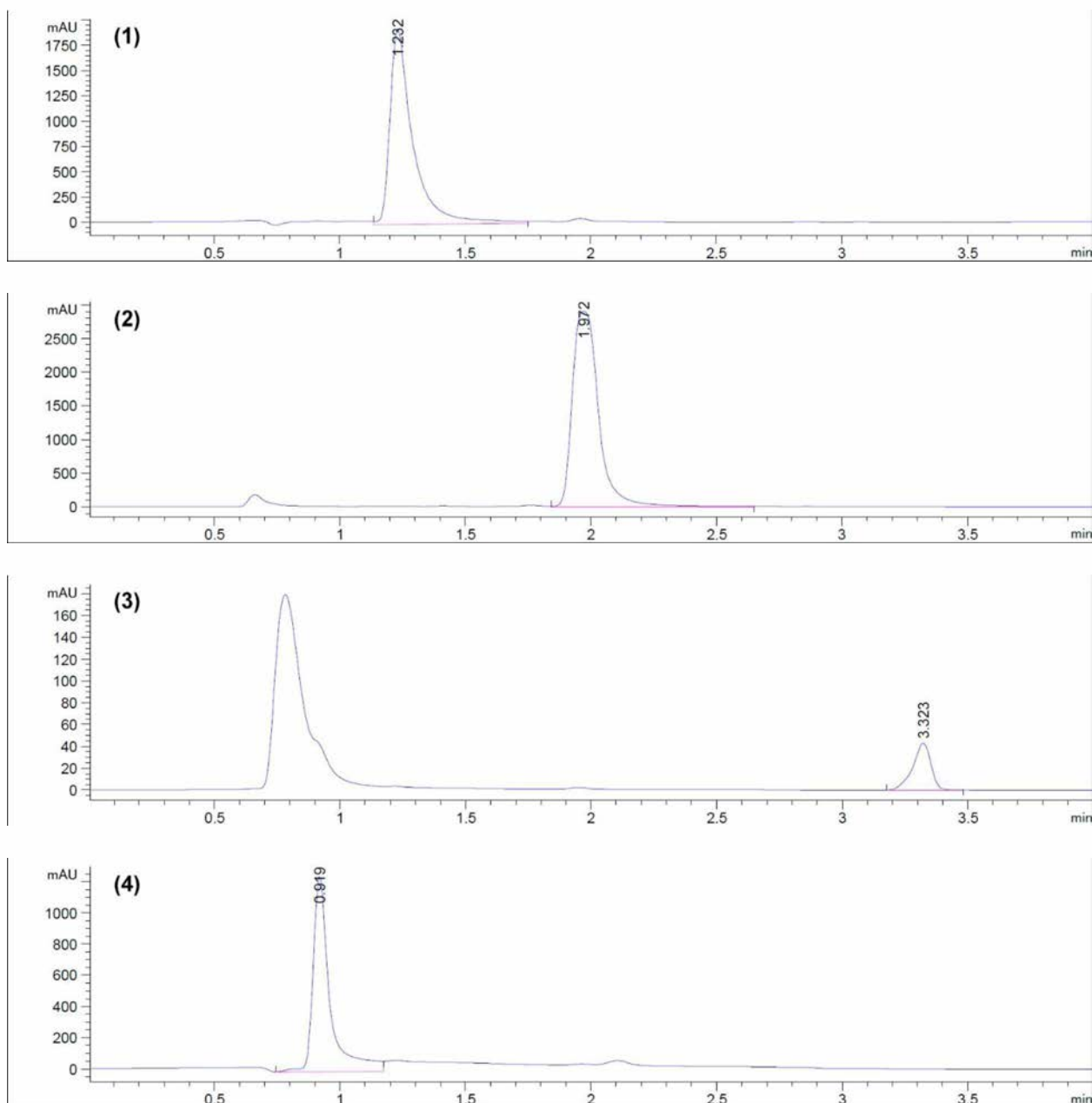
Для визначення оптимальних умов хроматографічного аналізу натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок, важливим є дослідження впливу температури на характеристики хроматографічного утримання, що суттєво впливає на ефективність і якість розділення сполук. Температура є критичним параметром, що визначає селективність і термодинаміку взаємодії аналітів із стаціонарною фазою, а також впливає на в'язкість елюенту, що, з оглядом на обмеження тиску під час роботи колонки, є корисним та потребує детального вивчення.

3.3.1 Параметри виконання хроматографічного дослідження залежності АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок від температури

Параметри приготування розчинів досліджуваних сполук описані у підрозділі 2.3. Хроматографічний аналіз виконували в ізократичному режимі, використовуючи як рухому фазу А - H_2O з 0,1% HCOOH , а як рухому фазу Б - CH_3CN з 0,1% HCOOH . Співвідношення рухомої фази А до фази Б складала 75 до 25% об'єму. Для хроматографічного розділення використовували колонку Zorbax SB-C18 (30 мм $\times$ 4,6 мм, 1,8 мкм) при робочій температурі в дев'яти різних значеннях: 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 та 70°C. Швидкість потоку елюенту встановлена на рівні 0,4 мл/хв. Об'єм інжекції 2 мкл. В процесі хроматографічного дослідження використовували діодно-матричний детектор, який працював на довжинах хвиль 232, 234, 246 та 260 нм.

3.3.2 Дослідження залежності хроматографічного утримання сполук від температури

Залежність хроматографічного утримання при 40°C для основної речовини АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** і кожної потенційної технологічної домішки: 2-(тіофен-2-іл)ацетогідазиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідазин-1-карбодіонату **2.2**, 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3** дослідили раніше в розділі 3.2.2 при проведенні дослідження залежності хроматографічного утримання від відсоткового вмісту ацетонітрилу у складі рухомої фази (стандартні умови температури при дослідженні складала 40°C) (рис. 3.19) [130].



Примітки: 1 – сполука 2.5, 2 – сполука 2.3, 3 – сполука 2.2, 4 – сполука 2.1.

Рисунок 3.19 – Хроматограми АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3** при 40°C.

Для визначення та оцінки термодинамічних характеристик процесу розподілу аналіту між рухомою та стаціонарною фазами під час

хроматографічного аналізу першочерговим завданням було визначення коефіцієнта утримання k . Цей параметр є ключовим показником, який відображає ступінь взаємодії аналіту зі стаціонарною фазою та визначає його затримку в колонці відносно компонентів, що не затримуються:

$$k = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} = \frac{V_S}{V_M} \quad (1)$$

де t_r - час утримання;

t_0 - час, за який рухома фаза (разом із компонентом, який не взаємодіє з нерухомою фазою, тобто не затримується в колонці) проходить через колонку до детектора (так званий «мертвий» час);

$\frac{V_S}{V_M}$ - співвідношення між кількістю аналіту, що знаходиться у стаціонарній фазі, та його кількістю у рухомій фазі.

Відношення об'єму мобільної фази до нерухомої відображаємо як β [131]:

$$\beta = \frac{V_M}{V_S} \quad (2)$$

Рівняння константи рівноваги перенесення речовини з рухомої фази в стаціонарну:

$$K = \frac{[A]_S}{[A]_M} = \frac{v_S}{v_m} \times \frac{V_M}{V_S} = k \times \beta \quad (3)$$

де $[A]_S$ – концентрація аналіту (досліджуваної речовини) у стаціонарній фазі;

$[A]_M$ – концентрація аналіту (досліджуваної речовини) у рухомій фазі;

v_S – швидкість перенесення речовини у стаціонарній фазі;

v_m – швидкість перенесення речовини у рухомій фазі;

V_M – об'єм рухомої фази;

V_S – об'єм стаціонарної фази в колонці;

k – коефіцієнт ємності, який відображає, в скільки разів речовина довше затримується в колонці порівняно з неутримуваним компонентом;

β – фазове співвідношення (відношення об'єму рухомої фази до об'єму стаціонарної).

Рівняння Вант-Гоффа [131]:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (4)$$

$$\ln(k \times \beta) = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (5)$$

де k – коефіцієнт ємності, який відображає, в скільки разів речовина довше затримується в колонці порівняно з неутримуваним компонентом;

β – фазове співвідношення (відношення об'єму рухомої фази до об'єму стаціонарної);

ΔH^0 – стандартна ентальпія сорбції;

ΔS^0 – стандартна ентропія сорбції;

R – універсальна газова стала;

T – абсолютна температура;

Виходячи з рівняння (5) отримуємо рівняння (6):

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} - \ln \beta \quad (6)$$

Приводимо його (6) до лінійної форми та отримуємо:

$$y = mx + b \quad (7)$$

де $y = \ln k$;

$x = 1/T$;

$m = -\Delta H^0/R$;

$b = \Delta S^0/R - \ln \beta$.

На наступному етапі для АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3** було побудовано залежність коефіцієнта ємності k від температури. Ці залежності дали змогу обчислити важливий термодинамічний параметр - ентальпію перенесення аналіту з рухомої фази до стаціонарної.

На рисунках 3.20 та 3.21 показаний вплив температури на хроматографічне утримання АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

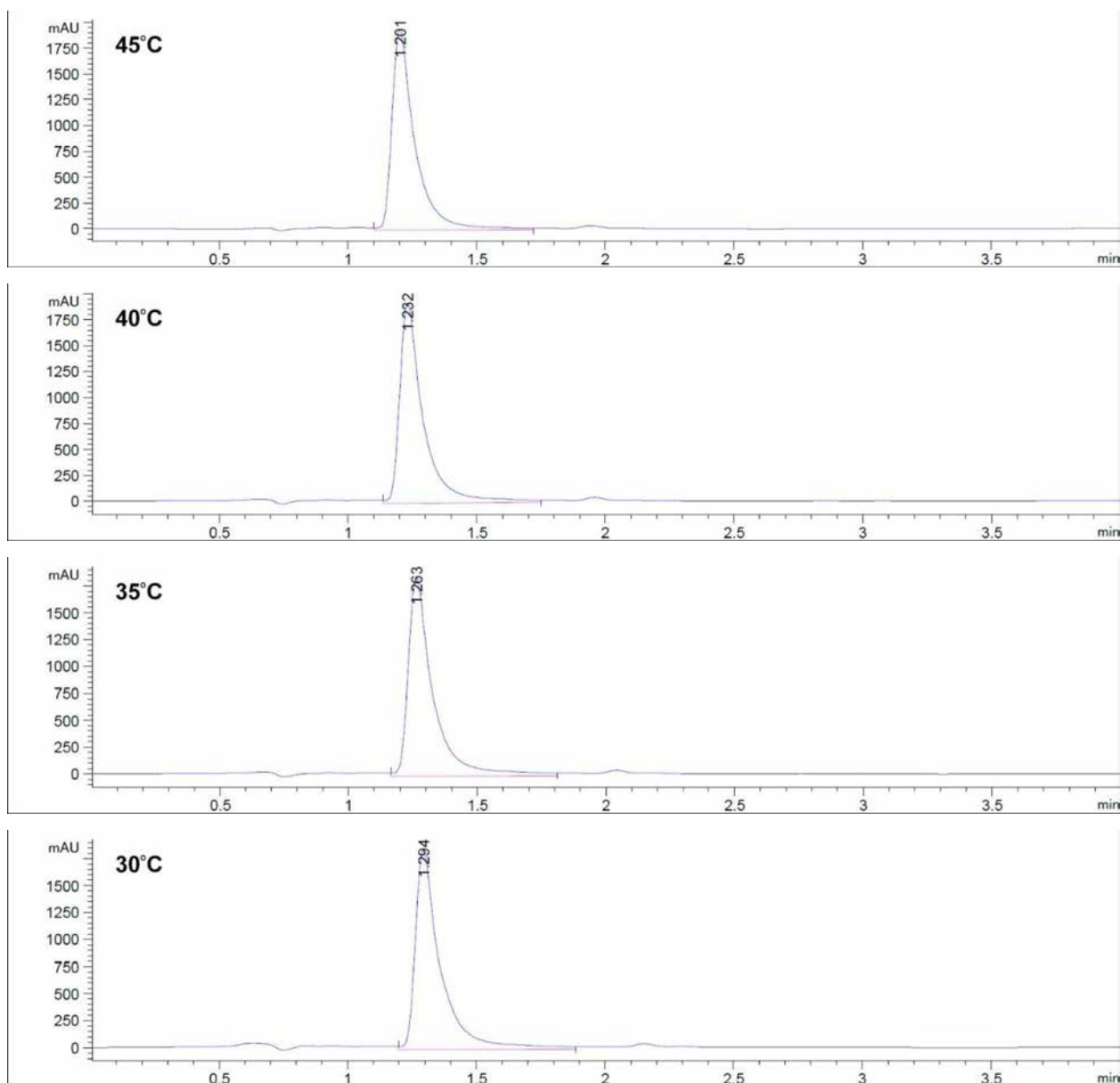


Рисунок 3.20 – Хроматограми АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** при різних значеннях температури (30-45°C).

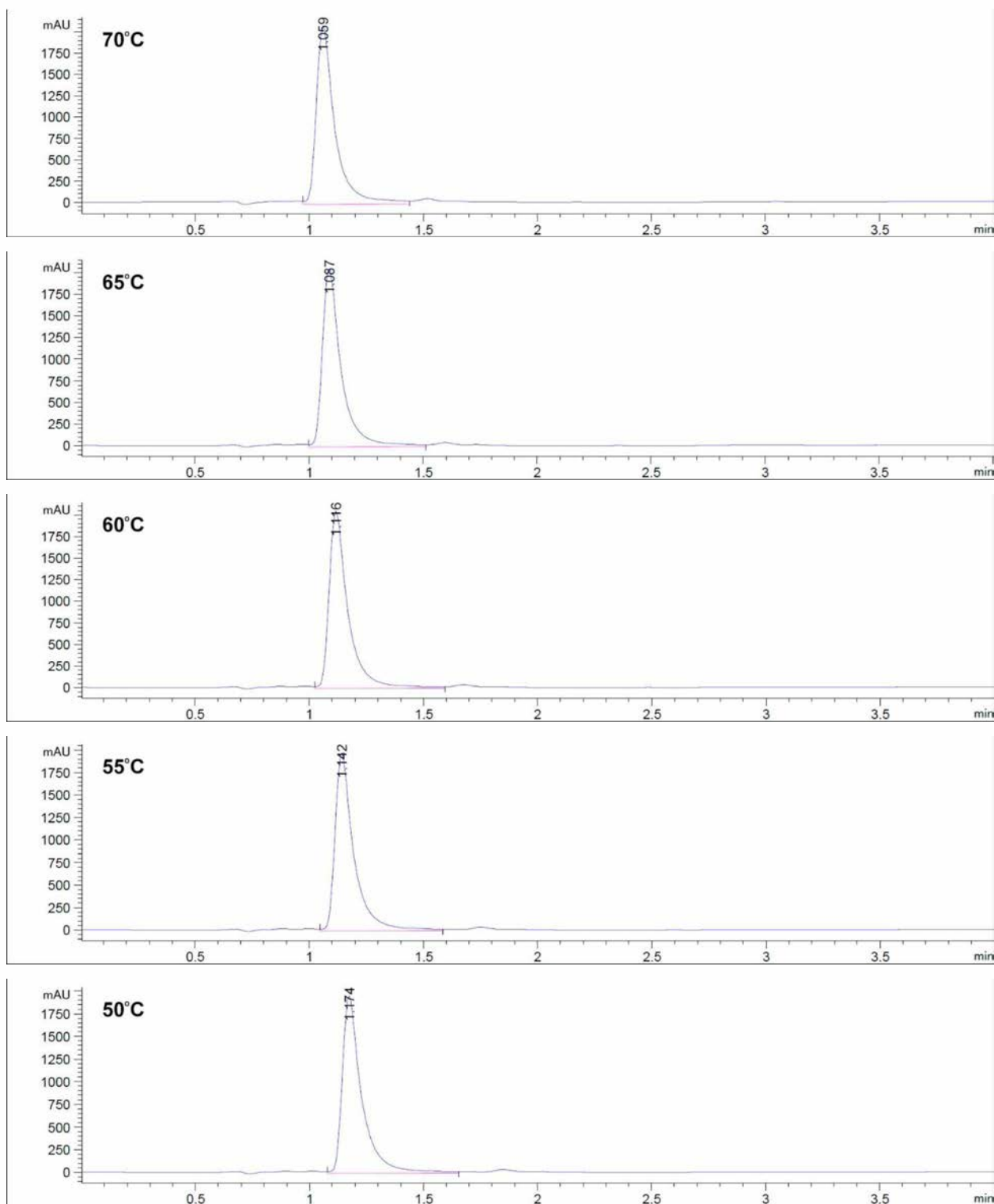


Рисунок 3.21 – Хроматограми АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** при різних значеннях температури (50-70°C).

В подальшому, за допомогою часу утримування KNO_3 , що був взятий як референтна речовина яка не утримується на хроматографічній колонці, визначили значення «мертвого часу» утримування. Його значення - 0,6 хв.

Для розрахунку коефіцієнта ємності k використано усереднені значення часу утримування аналізованих речовин, які були отримані в результаті хроматографічного аналізу при різних температурах колонки в діапазоні від 30 до 70 °С. Кожна досліджувана речовина при кожному значенні температури вводилась в систему ВЕРХ по 6 разів.

Таблиця 3.9 – Рівняння лінійної залежності $\ln k$ від $1/T$ (де $y=\ln k$, $x=1/T$) АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3**

№	Речовина	Рівняння	R^2	Стандартна похибка регресії, S
1.	2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид 2.1	$y=214.49x-1.318$	0.938	0.007767
2.	калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат 2.2	$y=1088.8x-3.439$	0.994	0.012108
3.	4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон 2.3	$y=1443.2x-3.766$	0.999	0.004872
4.	натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат 2.5	$y=817.35x-1.088$	0.995	0.007885

Використовуючи програму Microsoft Excel та метод найменших квадратів розраховували рівняння лінійної залежності $\ln k$ від $1/T$ (табл. 3.9) і побудували відповідний графік (рис. 3.22).

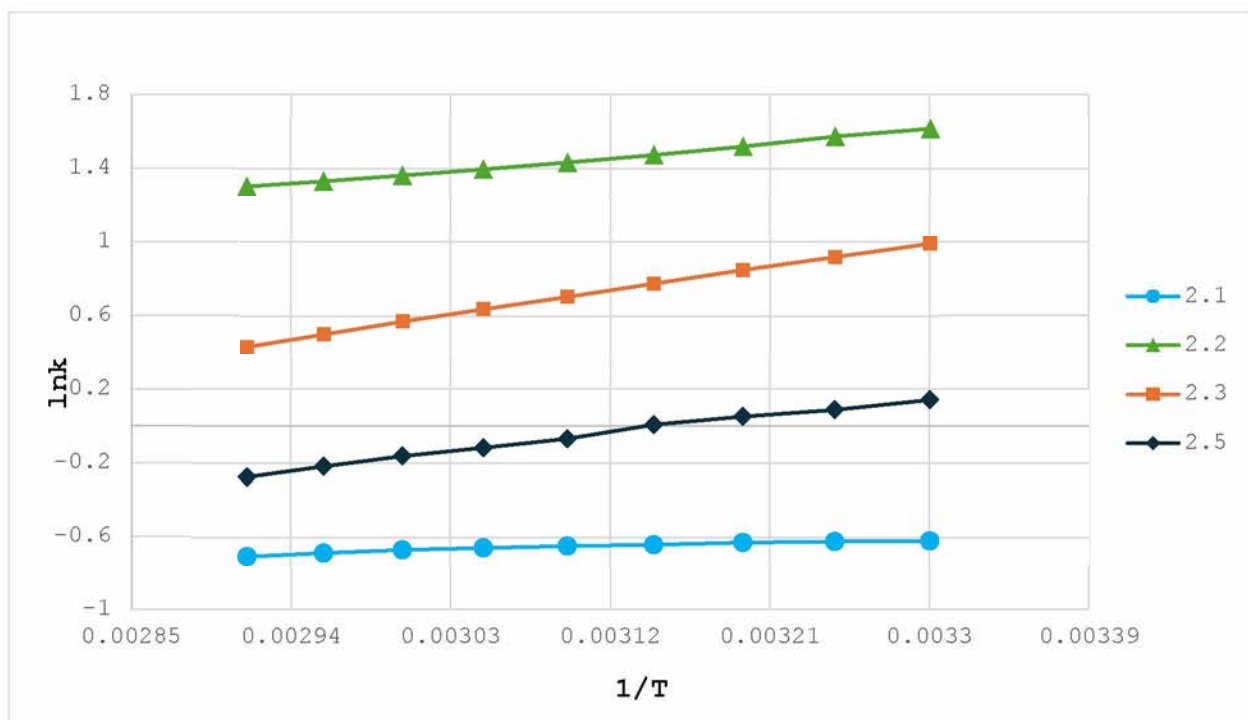


Рисунок 3.22 – Графік залежності $\ln k$ від $1/T$ АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3**.

На основі значення кутового коефіцієнта m було здійснено розрахунок стандартної ентальпії переносу аналіту з мобільної фази до стаціонарної (табл. 3.10):

$$\Delta H^0 = -m \times R \quad (8)$$

Обчислення ентальпії переносу для АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду

2.1, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3** наведені нижче:

$$\Delta H^0 = -1088,8 \times 8,31 = -9,05 \text{ кДж/моль} \quad \mathbf{2.5}$$

$$\Delta H^0 = -214,5 \times 8,31 = -1,78 \text{ кДж/моль} \quad \mathbf{2.1}$$

$$\Delta H^0 = -817,3 \times 8,31 = -6,79 \text{ кДж/моль} \quad \mathbf{2.2}$$

$$\Delta H^0 = -1443,2 \times 8,31 = -11,99 \text{ кДж/моль} \quad \mathbf{2.3}$$

Таблиця 3.10 – Стандартні ентальпії перенесення аналітів із мобільної фази у нерухому для АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**, 2-(тіофен-2-іл)ацетогідрозиду **2.1**, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** та 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3**

№	Речовина	ΔH^0 , кДж/моль
1.	2-(тіофен-2-іл)ацетогідрозид 2.1	-1.78
2.	калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат 2.2	-6,79
3.	4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-тіон 2.3	-1.78
4.	натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат 2.5	-1.78

Розраховані значення ентальпії переносу для всіх досліджених речовин мають від'ємні значення (табл. 3.10) [130]. Це свідчить про те, що процес переносу аналітів зі складу мобільної фази до стаціонарної (адсорбція на оберненофазовому сорбенті) супроводжується з виділенням тепла, тобто є екзотермічним, підвищення температури впливає на ефективність утримування речовин, яке відповідно до принципу Ле-Шательє знижується

при підвищенні температури, оскільки екзотермічні процеси загалом протікають менш інтенсивно.

3.4 Дослідження характеристик мас-спектрометричної фрагментації досліджуваних сполук

Для забезпечення якісної ідентифікації натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок за допомогою ВЕРХ з мас-спектрометричною детекцією важливим є вивчення характеристик їхньої фрагментації. Мас-спектрометрична фрагментація забезпечує отримання унікального спектрального «відбитку» досліджуваної молекули, що дозволяє не лише підтвердити її будову, а й диференціювати близькі за масою або структурою сполуки. Особливу увагу приділено оптимізації напруги фрагментації, яка визначає ступінь розпаду іонів, а також інтенсивність сигналу на мас детекторі. Проведене дослідження дозволяє встановити оптимальні умови іонізації та фрагментації, що забезпечують максимальну чутливість та селективність методу, необхідні для подальшого кількісного аналізу навіть у присутності структурно подібних домішок.

3.4.1 Параметри виконання хроматографічного дослідження мас-спектрометричної фрагментації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок

Параметри приготування розчинів досліджуваних сполук описані у підрозділі 2.3. ВЕРХ-МС дослідження проводили в ізократичному режимі, використовуючи раніше визначений склад рухомої фази А (H₂O з 0,1% HCOOH) і рухомої фази Б (CH₃CN з 0,1% HCOOH) із співвідношенням 75 до 25% об'єму (А до Б). Для хроматографічного розділення використовували колонку Zorbax SB-C18 (30 мм × 4,6 мм, 1,8 мкм) при робочій температурі 40°C. Швидкість потоку елюенту - 0,4 мл/хв, об'єм інжекції - 2 мкл. Діодно-

матричний детектор працював на довжинах хвиль 232, 234, 246 та 260 нм. Мас-спектрометричний детектор проводив сканування в режимі позитивної полярності в діапазоні 50-1000 m/z . Джерело іонів – електроспрей. Напругу на фрагменторі змінювали від 0 до 300 В.

3.4.2 Дослідження закономірностей мас-спектрометричної фрагментації АФІ та домішок до нього при іонізації в електроспреї

Натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат – на мас-спектрі при напрузі на фрагменторі 100 В спостерігається m/z 271,2, що відповідає основному квазімолекулярному протонованому йону 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, та m/z 273,2 - слабкий пік, який відповідає ізотопній формі основної молекули з ^{34}S замість ^{32}S (рис. 3.23). У нормі в досліджуваній молекулі є сірка масою 32, але частина молекул може містити її важчий варіант - ізоотоп 34. Це додає 2 одиниці маси, спостерігається пік m/z 273,2. Його поява - нормальне явище при аналізі сполук, що містять сірку, і підтверджує правильність ідентифікації.

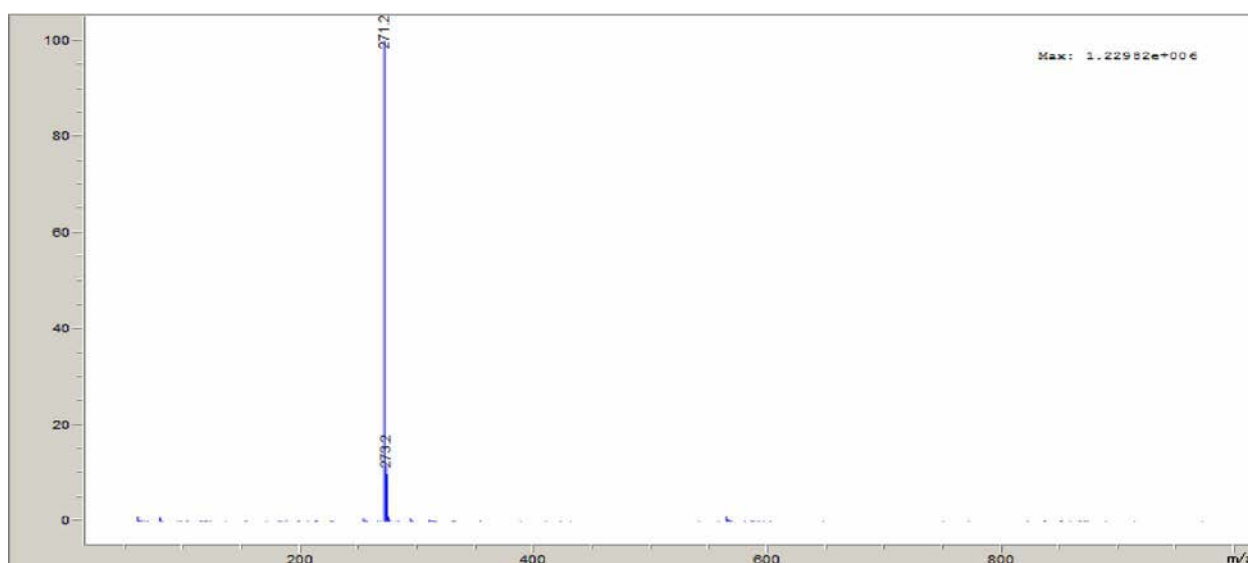


Рисунок 3.23 – Мас-спектр натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** при напрузі фрагментора 100 В.

При підвищенні напруги на фрагменторі до 200 В у мас-спектрі з'являється характерний (фрагмент дуже типовий для сполук, які містять тіофен) фрагментний йон із m/z 97,1 (рис. 3.24), який відповідає протонованому тіофенілметильному залишку (рис. 3.25). Його утворення обумовлено розривом зв'язку між тіофеновим залишком і 1,2,4-тріазольним ядром, що характерно для сполук з подібною структурою.

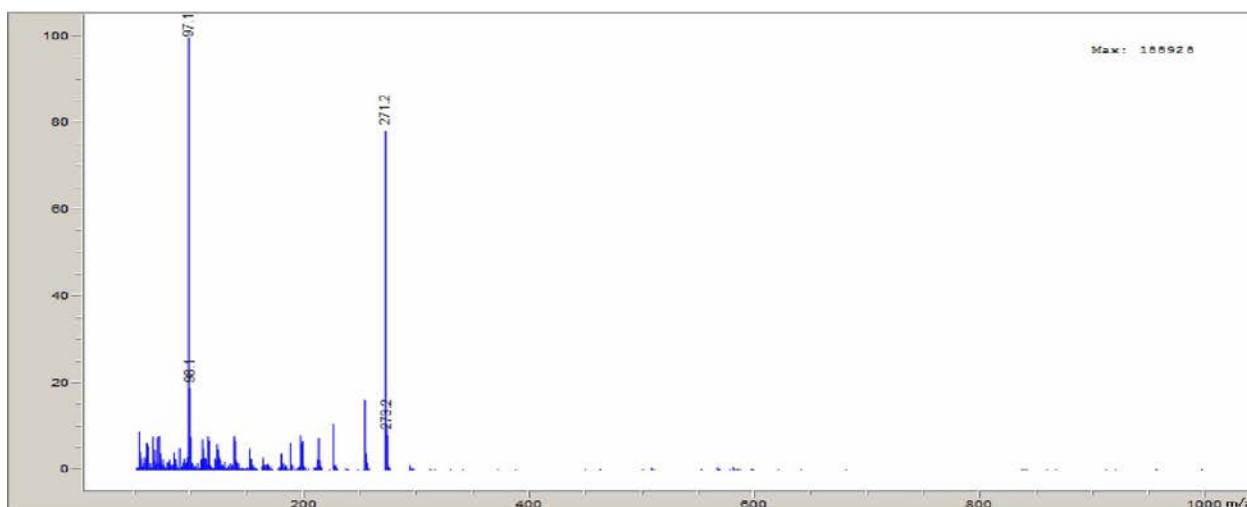


Рисунок 3.24 – Мас-спектр натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** при напрузі фрагментора 200 В.

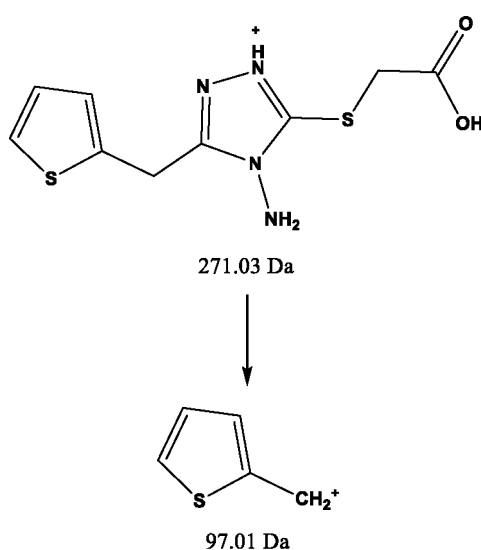


Рисунок 3.25 – Фрагментація натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** при напрузі фрагментора 200 В.

При збільшенні енергії фрагментації до 300 В у мас-спектрі протонованого йона 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату спостерігали появу характерних фрагментних йонів із m/z 84, 69 та 60 (рис. 3.26). Пік з m/z 84 відповідає уламку 1,2,4-тріазольного ядра, що утворюється внаслідок розриву 1,2,4-тріазольного кільця, або відповідає фрагменту тіофенового залишку. Поява фрагменту з m/z 69 відповідає аліфатичному катіону, утвореному внаслідок розриву зв'язків між 1,2,4-тріазольним кільцем і сусідніми групами. Пік з m/z 60 асоціюється із фрагментом карбоксильної природи, що свідчить про відщеплення ацетатної частини молекули. Схематичне зображення утворення можливих фрагментів показано на рисунку 3.27.

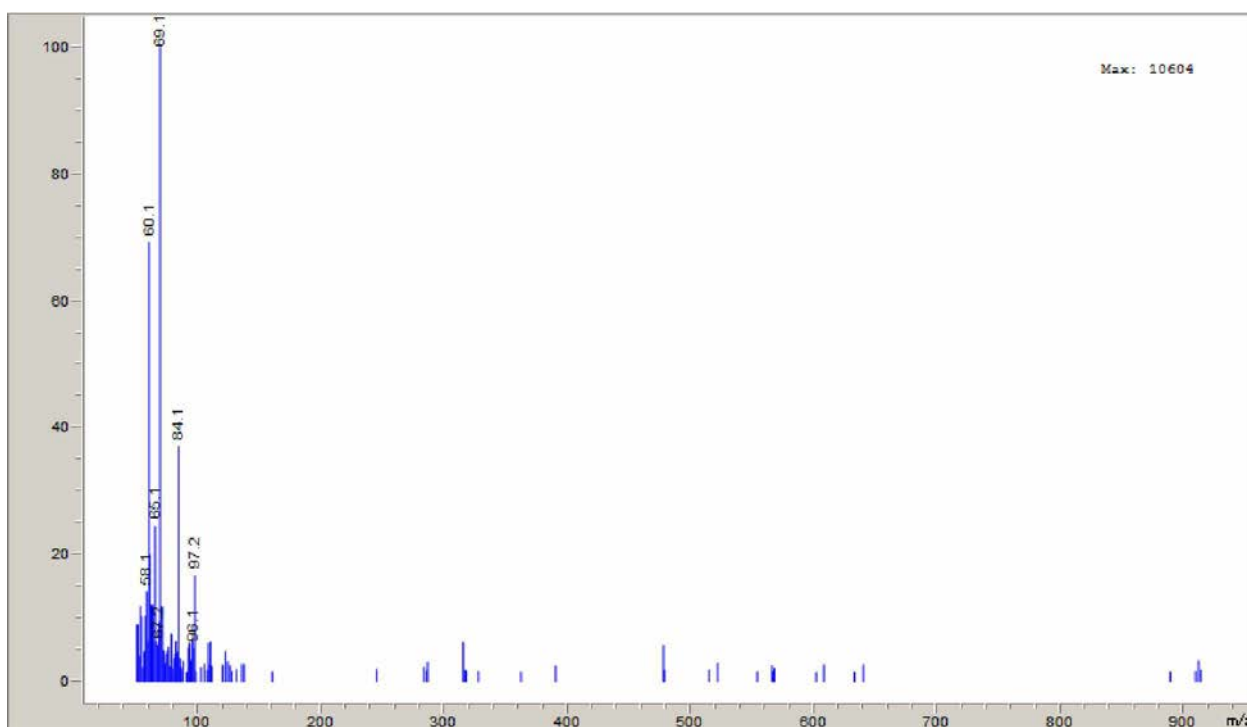


Рисунок 3.26 – Мас-спектр натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** при напрузі фрагментатора 300 В.

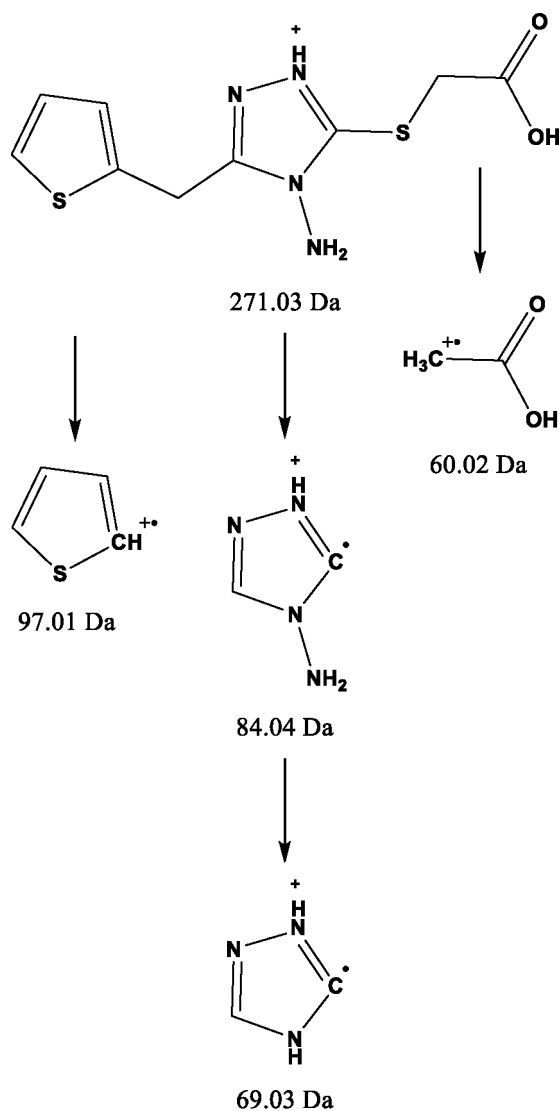
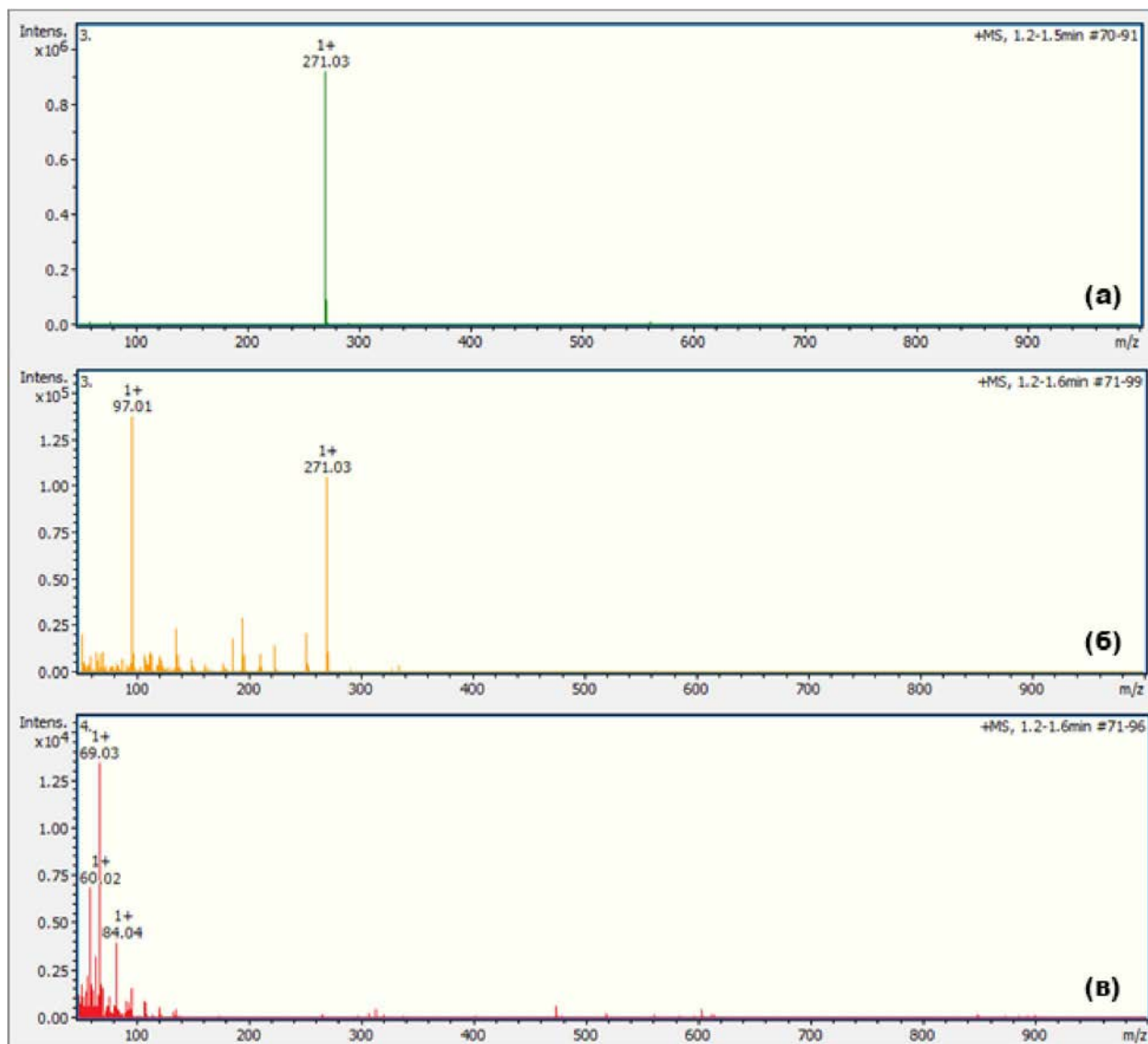


Рисунок 3.27 – Фрагментація натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** при напрузі фрагментора 300 В.

Варто відмітити, що стандартні показники m/z для використаного під час дослідження мас-спектрометра мають незначну допустиму похибку. Для більшої точності результатів при дослідженні фрагментації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** проведено обробку мас-спектрів за допомогою Bruker Compass DataAnalysis (Bruker Corporation, Bruker Daltonics GmbH) (рис. 3.28).



Примітки: а – 100 В, б – 200 В, в – 300 В.

Рисунок 3.28 – Оброблені та інтерпретовані за допомогою Bruker Compass DataAnalysis мас-спектри натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** при різних напрузі фрагментора.

Під час аналізу мас-спектрів спостерігається перекриття піків із близькими значеннями m/z . Для їх точного розділення застосовували деконволюцію, яка дозволила математично виділити індивідуальні йонні сигнали, що дало змогу коректно інтерпретувати фрагменти АФІ навіть у випадках складного спектрального профілю при високому значенні фрагментації.

Для підвищення надійності аналізу та усунення впливу фонового шуму було застосовано фільтрацію шуму, що дозволило сконцентруватися на репрезентативних йонах, що мають значення при дослідженні фрагментації.

Для структурного аналізу фрагментів використовували модуль визначення точної маси та ізотопного профілю. Завдяки високій точності вимірювання m/z стала можливою побудова молекулярних формул для окремих фрагментів із урахуванням допустимої похибки. Також проводили розрахунок ізотопних розподілів, що дало змогу підтвердити наявність певних гетероеlementів (зокрема, атомів сірки) у складі фрагментів домішок.

Отримані результати свідчать про послідовну фрагментацію АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** за підвищеної енергії, з утворенням стабільних фрагментних йонів, що відображають ключові структурні елементи вихідної молекули.

2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид – при напрузі фрагментації 100 В у мас-спектрі 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду спостерігається основний квазімолекулярний пік m/z 157, що відповідає протонованій молекулі, а також фрагментний йон з m/z 97 (рис. 3.29), що утворюється внаслідок розриву зв'язку між карбонільним фрагментом і карбону, із подальшим утворенням стабільного тіофен-метильного катіону (рис. 3.30).

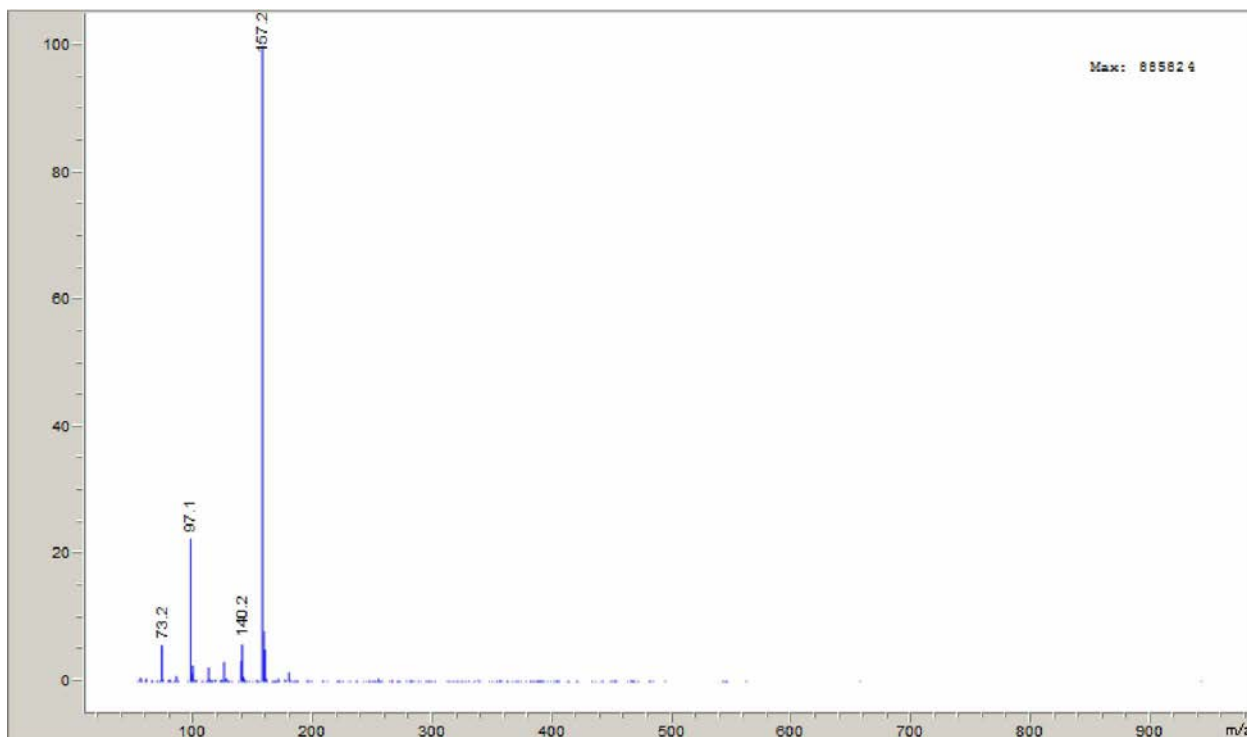


Рисунок 3.29 – Мас-спектр 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1** при напрузі фрагментатора 100 В.

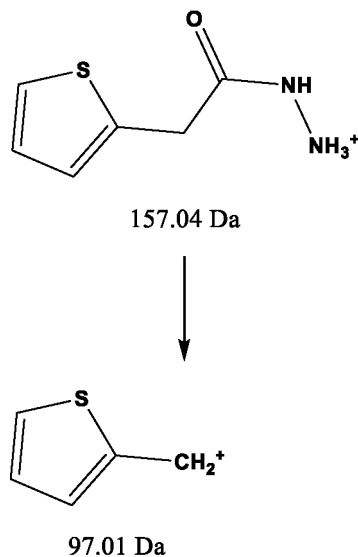


Рисунок 3.30 – Фрагментація 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1** при напрузі фрагментатора 100 В.

При збільшенні напруги фрагментації до 200 В у мас-спектрі 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду основна молекула повністю фрагментується, спостерігається попередній фрагмент з m/z 97 (тіофен- CH_2^+), що є дуже

стабільним через ароматичну природу тіофенового кільця і навіть при високій фрагментації буде детектуватись. Але при збільшенні напруги на фрагменторі також утворюється новий фрагмент з m/z 53 (рис. 3.31), що виникає внаслідок подальшого розпаду тіофенового ядра з втратою атома сірки та утворенням стабільного аліциклічного катіону $C_4H_5^+$ (рис. 3.32).

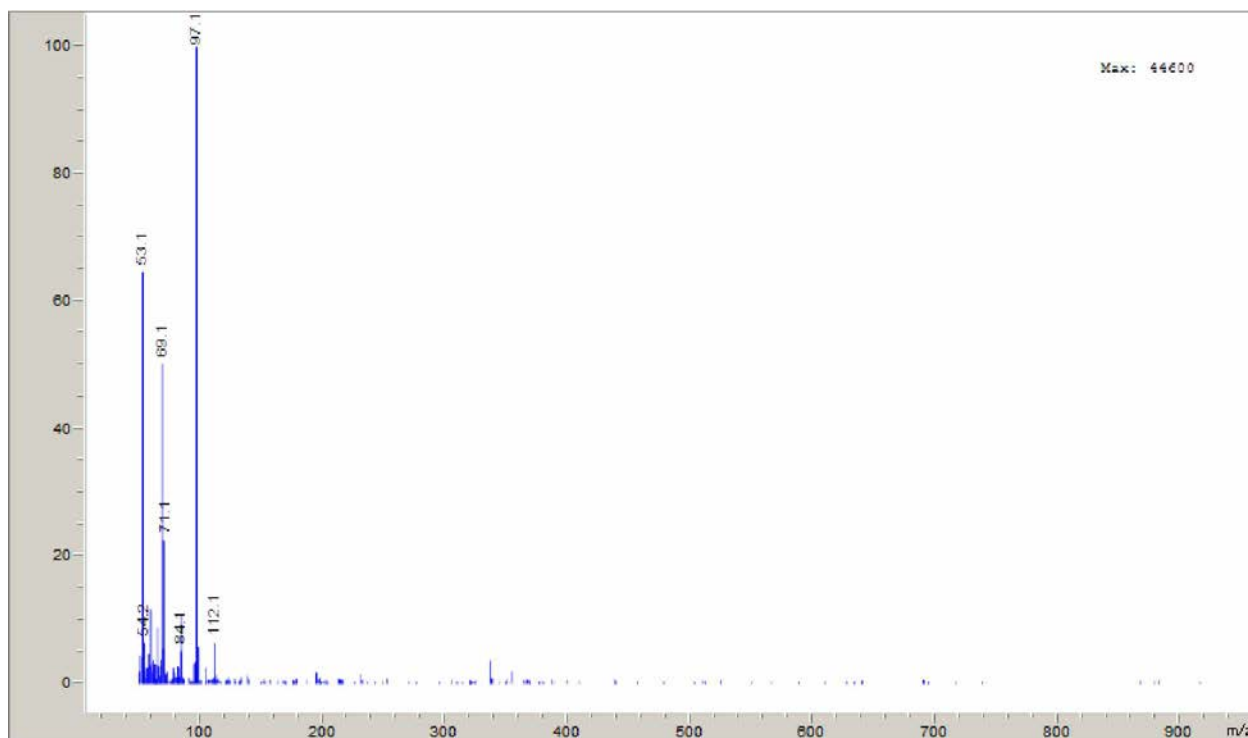


Рисунок 3.31 – Мас-спектр 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1** при напрузі фрагментатора 200 В.

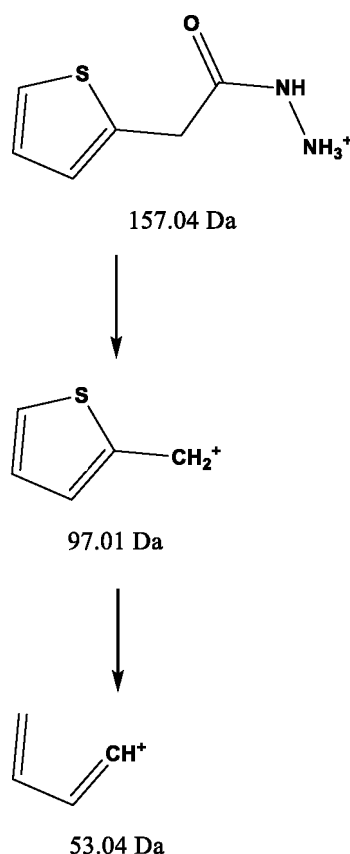


Рисунок 3.32 – Фрагментація 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1** при напрузі фрагментатора 200 В.

При подальшому підвищенні напруги фрагментації до 300 В у спектрі 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду спостерігається поява фрагментного йону з m/z 60 (рис. 3.33), що відповідає за гідразидний залишок ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}^+$). Це свідчить про повний розрив молекули на два основні фрагменти - тіофеновий (m/z 97) та гідразидний (m/z 60), що є логічним наслідком високої енергії фрагментації (рис. 3.34).

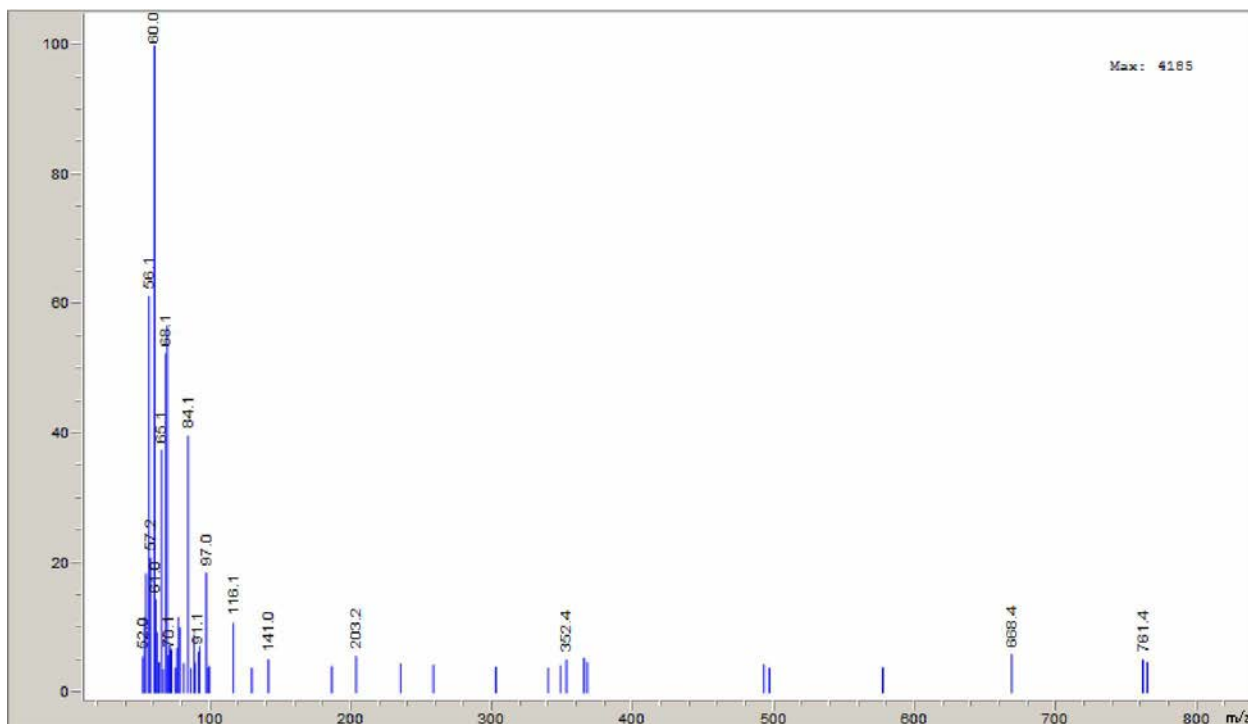


Рисунок 3.33 – Мас-спектр 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1** при напрузі фрагментора 300 В.

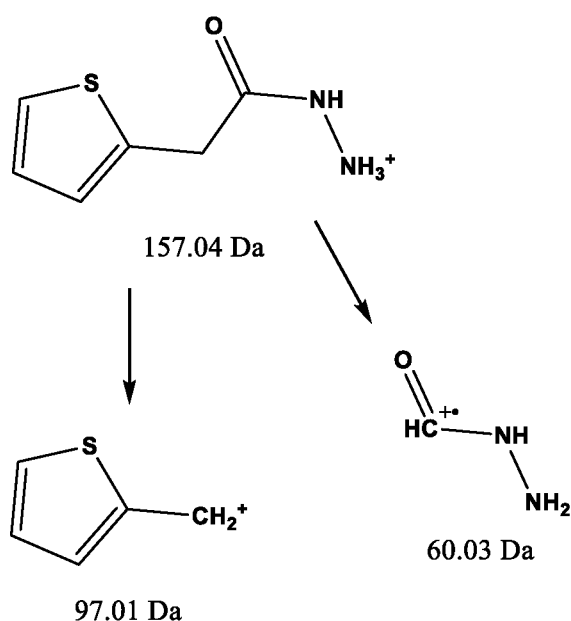


Рисунок 3.34 – Фрагментація 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1** при напрузі фрагментора 300 В.

Калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат – у мас-спектрі калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату (рис. 3.35) при

напрузі на фрагменторі 100 В основним виявлено пік з m/z 199, що відповідає протонованому квазімолекулярному йону $[M+H]^+$. Також виявлена ізотопна форма цього йону, яка може бути обумовлена наявністю атомів ^{13}C , пік з m/z 200 спостерігається з інтенсивністю близько 10% сигналу. Фрагмент з m/z 157 свідчить про втрату фрагменту карбодіонатної природи, що відповідає фрагменту $[M+H]^+$ основного квазімолекулярного йона 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду **2.1**, який утворюється внаслідок елімінації фрагмента карбодіонатної природи, що є типовим для нестабільних груп карбаматної будови (рис. 3.36).

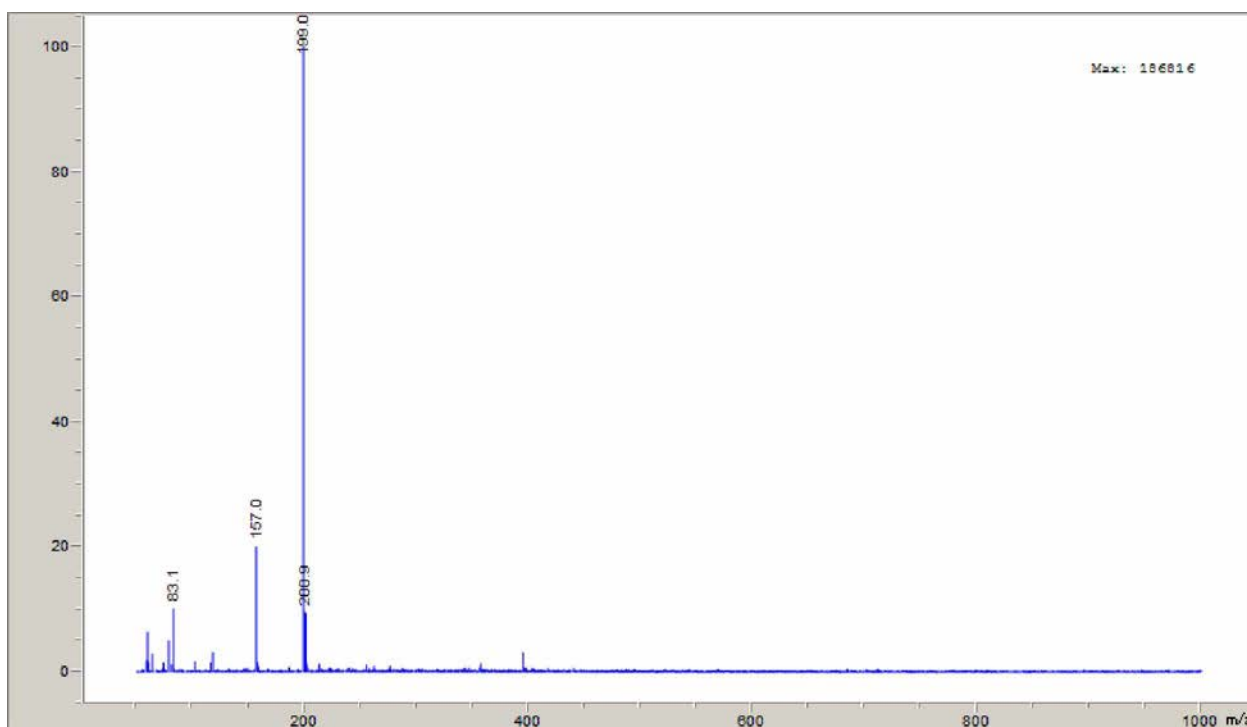


Рисунок 3.35 – Мас-спектр калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** при напрузі фрагментора 100 В.

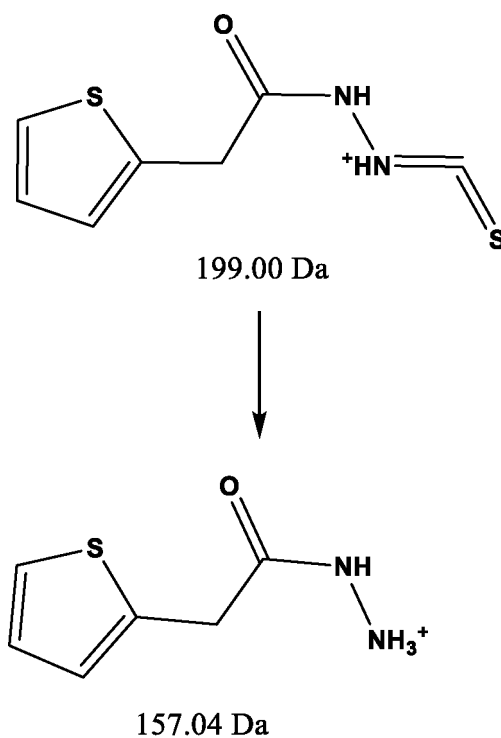


Рисунок 3.36 – Фрагментація калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** при напрузі фрагментора 100 В.

При збільшенні напруги фрагментації до 200 В для сполуки калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату у мас-спектрі спостерігаються фрагменти з m/z 97 та 53 (рис. 3.37).

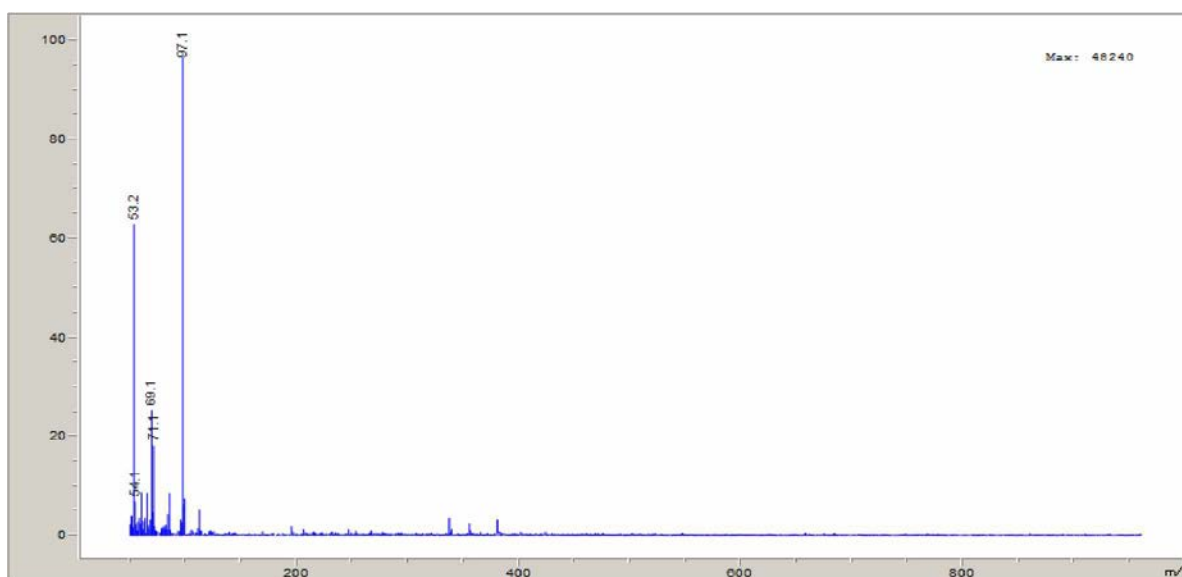


Рисунок 3.37 – Мас-спектр калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** при напрузі фрагментора 200 В.

Фрагмент з m/z 97 відповідає тіофен- CH_2^+ катіону, що утворюється внаслідок гомолітичного або гетеролітичного розриву зв'язку між тіофеновим кільцем та залишком нативної молекули. Фрагмент з m/z 54 є результатом подальшої фрагментації тіофенового ядра. В умовах високої енергії фрагментації тіофеновий фрагмент ($\text{C}_5\text{H}_5\text{S}^+$) може втрачати атом сірки (S) з утворенням стабільного аліциклічного карбокатиона C_4H_5^+ . Схематичне зображення утворення можливих фрагментів показано на рисунку 3.38.

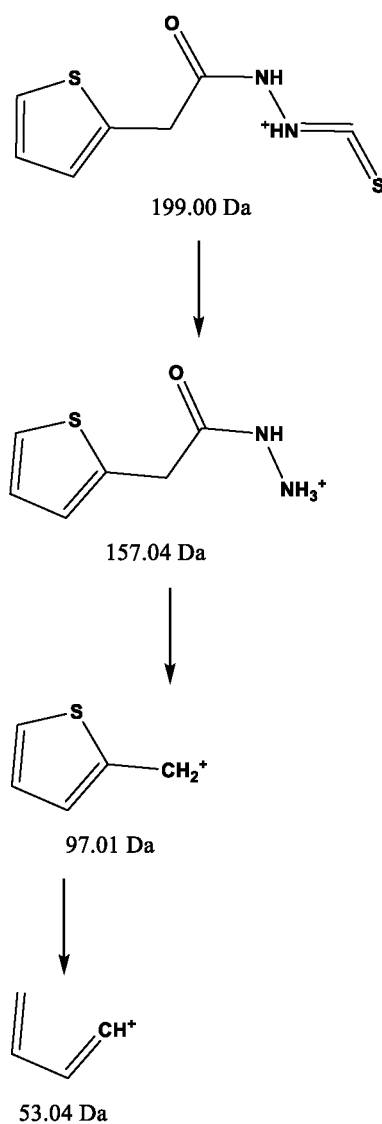


Рисунок 3.38 – Фрагментація калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** при напрузі фрагментора 200 В.

При подальшому підвищенні напруги фрагментації до 300 В, у мас-спектрі сполуки **2.2** спостерігається утворення фрагмента з m/z 60 (рис. 3.39), який відповідає йону $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}^+$ - гідразидному залишку. Утворення даного фрагменту можна пояснити тим, що при 300 В більшість молекули розпадається до мінімально стабільних фрагментів, втрачається більша частина органічного скелету, але гідразидна частина залишається як стабільний катіон, що й спостерігається як пік m/z 60 (рис. 3.40).



Рисунок 3.39 – Мас-спектр калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** при напрузі фрагментатора 300 В.

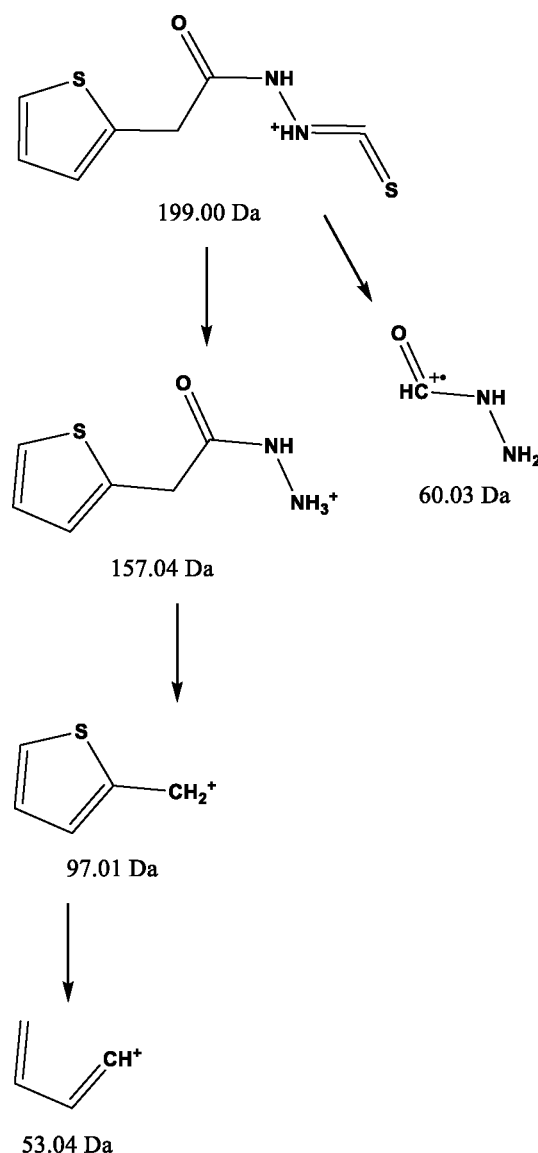


Рисунок 3.40 – Фрагментація калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату **2.2** при напрузі фрагментора 300 В.

4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон – у мас-спектрі 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону **2.3** (рис. 3.41) при енергії фрагментації 100 В спостерігається основний інтенсивний пік з m/z 213, що відповідає протонованому квазімолекулярному йону $[\text{M}+\text{H}]^+$, та ізотопний пік з m/z 214 з меншою інтенсивністю (~10%), що є ізотопним супутником основного піка, який обумовлений присутністю ^{13}C в структурі сполуки.



Рисунок 3.41 – Мас-спектр 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон **2.3** при напрузі фрагментора 100 В.

При збільшенні енергії фрагментації до 200 В в мас-спектрі сполуки **2.3** з'являються характерні фрагменти (рис. 3.42) m/z 97, що відповідає тіофенметильному катіону, що утворюється внаслідок відриву тіофенметильної групи від 1,2,4-тріазольного ядра, та m/z 53, що утворюється внаслідок подальшого розпаду тіофенового фрагмента з утворенням стабільного $C_4H_5^+$ катіону.

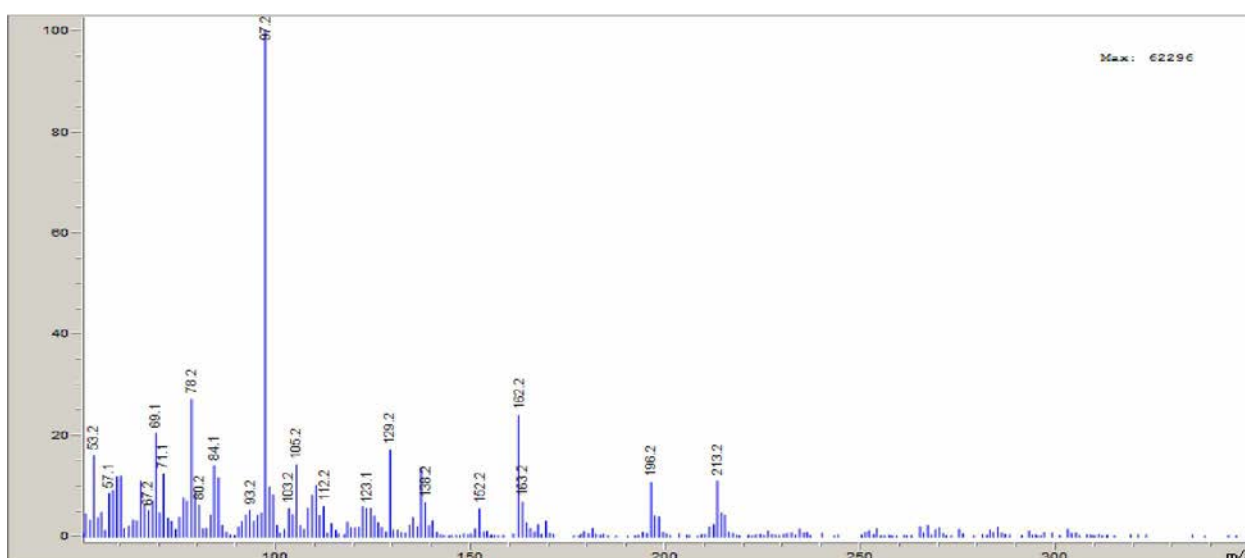


Рисунок 3.42 – Мас-спектр 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон **2.3** при напрузі фрагментора 200 В.

Обидва іони є типовими продуктами фрагментації (рис. 3.43).

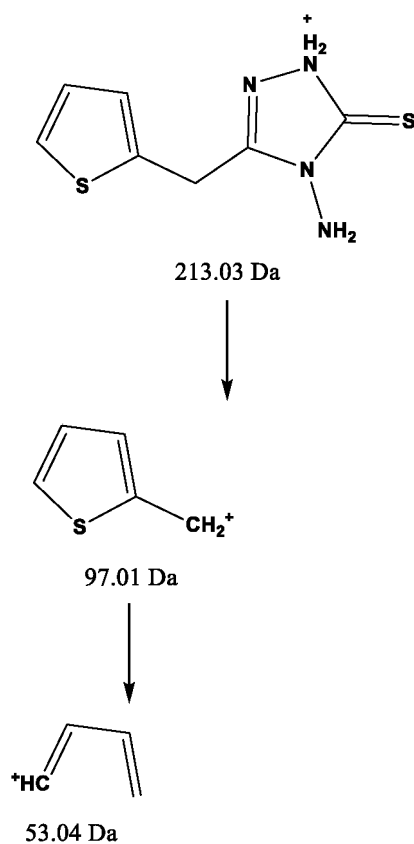


Рисунок 3.43 – Фрагментація 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон **2.3** при напрузі фрагментатора 200 В.

При подальшому збільшенні енергії фрагментації до 300 В у мас-спектрі з високою інтенсивністю присутній m/z 97 (тіофен- CH_2^+ катіон) та з'являються фрагменти m/z 84 та m/z 69 (рис. 3.44), що є наслідком глибокої деструкції 1,2,4-тріазольного циклу та тіофенметильного залишку.

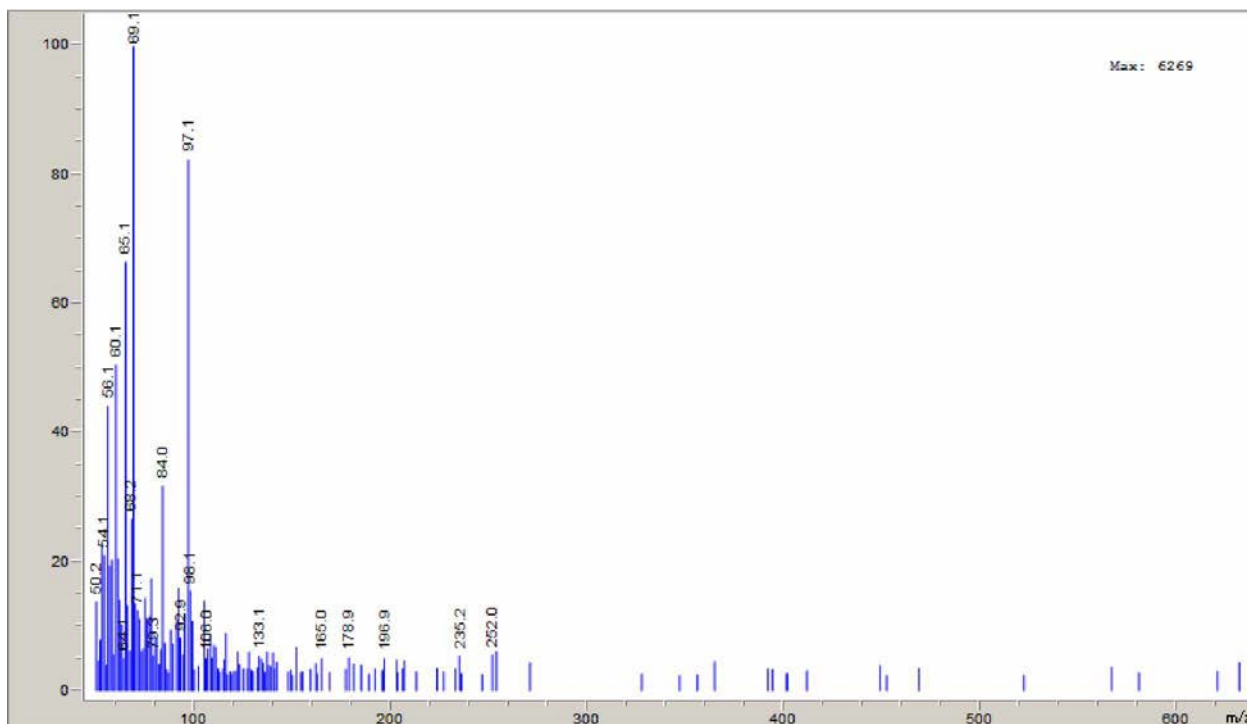


Рисунок 3.44 – Мас-спектр 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон **2.3** при напрузі фрагментора 300 В.

Іон m/z 84 ймовірно відповідає фрагменту з аміногрупами та сіркою, а m/z 69 - стабільному аліциклічному або азотвмісному фрагменту, що виникає при розпаді тіофену або тріазолу відповідно (рис. 3.45).

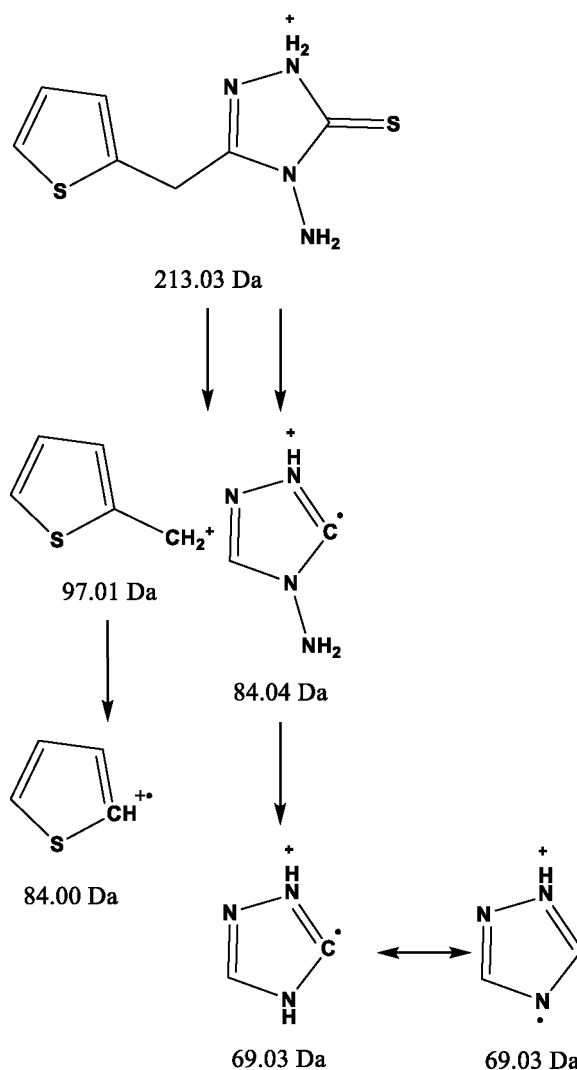


Рисунок 3.45 – Фрагментація 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон **2.3** при напрузі фрагментора 300 В.

У мас-спектрах усіх досліджених тіофен- і 1,2,4-тріазолвмісних похідних виявлено типові фрагменти, які повторюються при зростанні енергії фрагментації. Найстійкішим є фрагмент з m/z 97 (тіофен-CH₂⁺), що детектується в мас-спектрах всіх досліджуваних сполук. Фрагмент з m/z 53 є характерним продуктом подальшого розпаду тіофенового кільця. При 300 В спостерігаються йони (m/z 84, 69, 60), що утворюються в наслідок руйнування 1,2,4-тріазольного та гідразинового фрагментів, що дозволяє підтверджувати структури та наявність функціональних груп.

Закономірності фрагментації можуть бути використані для ідентифікації досліджуваних сполук, а спільний для всіх речовин фрагмент, а саме тіофен-2-ілметил (m/z 97) може бути використаний як характеристичний йон.

3.5 Валідація хроматографічної методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Для забезпечення надійності та відтворюваності результатів визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою високоефективної рідинної хроматографії критично важливим є проведення валідації розробленої методики. Валідація дозволяє підтвердити відповідність методу встановленим критеріям якості, таким як точність, прецизійність, лінійність, межа виявлення та кількісного визначення, специфічність, а також стабільність зразків у процесі аналізу [111, 115-119]. Проведена валідація підтверджує, що розроблена методика відповідає сучасним вимогам фармакопей та придатна для застосування у контролі якості лікарських засобів [132].

3.5.1 Параметри виконання валідації ВЕРХ методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції

При виконанні дослідження використана субстанція АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, а також стандартний робочий зразок відповідного АФІ які були передані кафедрою токсикологічної та неорганічної хімії (д. фарм. н., доцент Сафонов А. А.) Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Якісні та кількісні показники щодо основної речовини і супутніх домішок закладені в основу проекту МКЯ на субстанцію натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату для подальшого створення парентеральних

лікарських форм [110]. Будову та чистоту стандартного робочого зразку (СРЗ) підтверджено даними ^1H ЯМР-спектроскопії, а кількість основної речовини, натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату підтверджена методом неводного потенціометричного титрування [110].

В якості розчинників та реагентів використано ацетонітрил (CH_3CN) для ВЕРХ класифікації Super Gradient («Avantor Performance Materials Poland S.A.», Польща), мурашина кислота (HCOOH) класифікації «For analysis» (98%) («AppliChem GmbH», Німеччина) та високоочищена вода (Q_3 , 18 МΩ, 25 °C).

Аналіз проводили за допомогою ВЕРХ-ДМД (Agilent 1260 Infinity HPLC System), що включає дегазатор, бінарний насос, автосамплер, термостат для колонки та діодно-матричний детектор. Контроль, управління процесом аналізу і обробку даних виконували за допомогою ліцензійного програмного забезпечення Agilent OpenLAB Software CDS.

Вибір умов хроматографічного аналізу обґрунтовано в підрозділі 3.2 та 3.3. ВЕРХ дослідження проводили в ізократичному режимі. Використовували рухоми фазу А (H_2O з 0,1% HCOOH) і Б (CH_3CN з 0,1% HCOOH). Співвідношення рухомої фази А до Б – 75% до 25% (за об'ємом). Для хроматографічного розділення використовували колонку Zorbax SB-C18 (30 мм × 4,6 мм, 1,8 мкм). Температуру колонки підтримували на рівні 40°C. Швидкість потоку елюенту - 0,4 мл/хв, об'єм інжекції - 2 мкл. Діодно-матричний детектор працював на довжині хвилі 232 нм. Загальний час аналізу 3 хвилини.

Для приготування рухомої фази А 1 мл HCOOH вносять до мірної колби (об'ємом 1000 мл) і розчиняють у 100 мл води високої очистки, після чого тим самим розчинником доводять об'єм розчину до позначки та ретельно перемішують.

Для приготування рухомої фази Б 1 мл HCOOH вносять до мірної колби (об'ємом 1000 мл) і розчиняють у 100 мл ацетонітрилу, після чого тим самим розчинником доводять об'єм розчину до позначки та ретельно перемішують.

Розчин стандартного робочого зразка натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (100 мкг/мл) готували шляхом розчинення 0,01 г робочого стандартного зразка у 50 мл води високої очистки та подальшим доведенням цим же розчинником до мітки мірної колби (мірна колба 100 мл, клас «А»). Ретельно перемішати.

Для тестування лінійності методу виготовлено 9 модельних розчинів субстанції для діапазону застосування методу 80-120% відносно номінального вмісту.

3.5.2 Дослідження чутливості та селективності ВЕРХ методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Нижню межу кількісного визначення (LLOQ) встановлювали на основі модельної суміші, для якої співвідношення сигналу до шуму (S/N) повинно становити не менше 5:1. При цьому прецизійність визначення не повинна перевищувати 20%, а отримане значення LLOQ не повинно відхилятися більш ніж на 20% від фактичного вмісту аналіту, введенного до модельної суміші.

Для встановлення LLOQ проаналізовано зразок контрольної концентрації, що становить 10 мкг/мл (рис. 3.46, 3.47). Отримане значення відношення сигнал/шум для даного зразка становить 12,6, що перевищує мінімально допустиме значення згідно з вимогами [124, 133] ($S/N \geq 5$ для кількісного визначення).

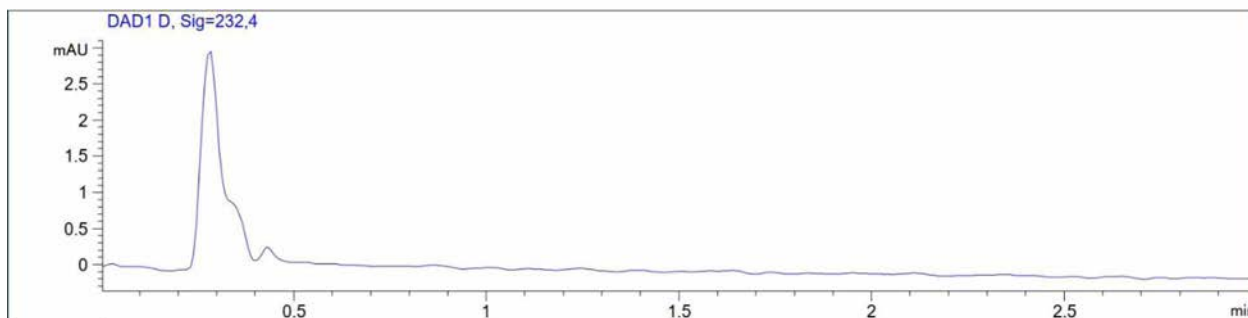


Рисунок 3.46 – Хроматограма бланк зразку.

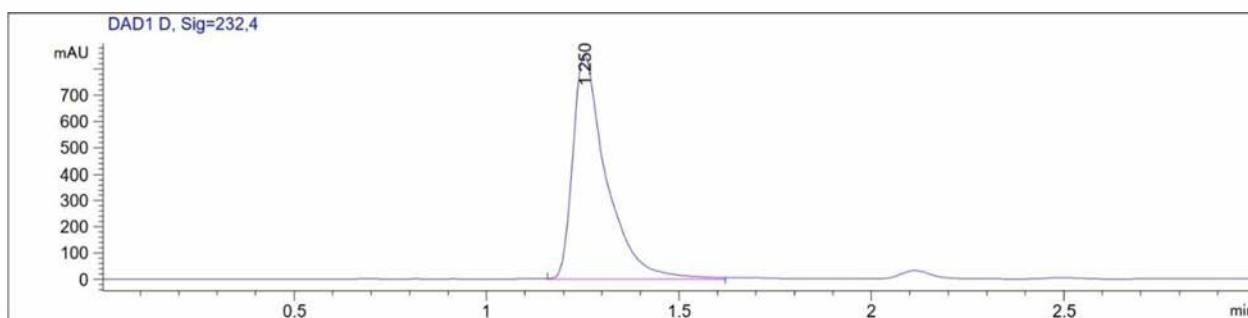


Рисунок 3.47 – Хроматограма CPЗ АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 232 нм на межі LLOQ.

3.5.3 Дослідження прецизійності, лінійності та правильності ВЕРХ методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Для визначення повторюваності (repeatability) результатів при повторному інжектуюванні по черзі вводимо розчин субстанції АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату «n» разів та обчислюємо RSD для площі піку АФІ. Усі вимірювання проведені в максимально ідентичних умовах. Відповідно до вимог Державної Фармакопеї України [103] та Європейської Фармакопеї [104], якщо отримане значення не перевищує $RSD_{\max}$ (2%) – методика вважається прецизійною. Результати вивчення наведені в табл. 3.11.

Таблиця 3.11 – Результати вивчення відтворюваності результатів ВЕРХ методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** в субстанції

№	Час утримання	Площа піку
1.	1.25	9464.73
2.	1.24	9579.11
3.	1.24	9462.12
4.	1.25	9685.87
5.	1.26	9667.47
6.	1.25	9581.98
Відповідність вимогам ЄФ та ДФУ ($RSD_{\max} < 2\%$)		$RSD = \frac{s}{\bar{x}} = \frac{95.7048}{9573.5467} = 1\%$

Для визначення внутрішньолaboratorної прецизійності експеримент повторюваності результатів повторили через тиждень. Результати вивчення наведені в табл. 3.12.

Таблиця 3.12 – Результати вивчення внутрішньолaboratorної прецизійності ВЕРХ методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** в субстанції

№	Час утримання	Площа піку
1.	1.26	9491.17
2.	1.25	9682.97
3.	1.24	9497.27
4.	1.25	9670.39
5.	1.25	9455.08
6.	1.25	9632.42
Відповідність вимогам ЄФ та ДФУ ($RSD_{\max} \leq 2\%$)		$RSD = \frac{s}{\bar{x}} = \frac{101.4206}{9571.55} = 1.06\%$

Під час визначення лінійності калібрувальний графік побудували на основі залежності сигналу діодно-матричного детектора від концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в розчині, що відповідає методу зовнішнього стандарту. У межах концентрацій 8-12 мкг/мл була зафіксована лінійна залежність. Отримане рівняння регресії: $y = 9538,4x + 62,471$ з коефіцієнтом детермінації $R^2 = 0,9981$, що свідчить про відмінну лінійність методу (рис. 3.48).

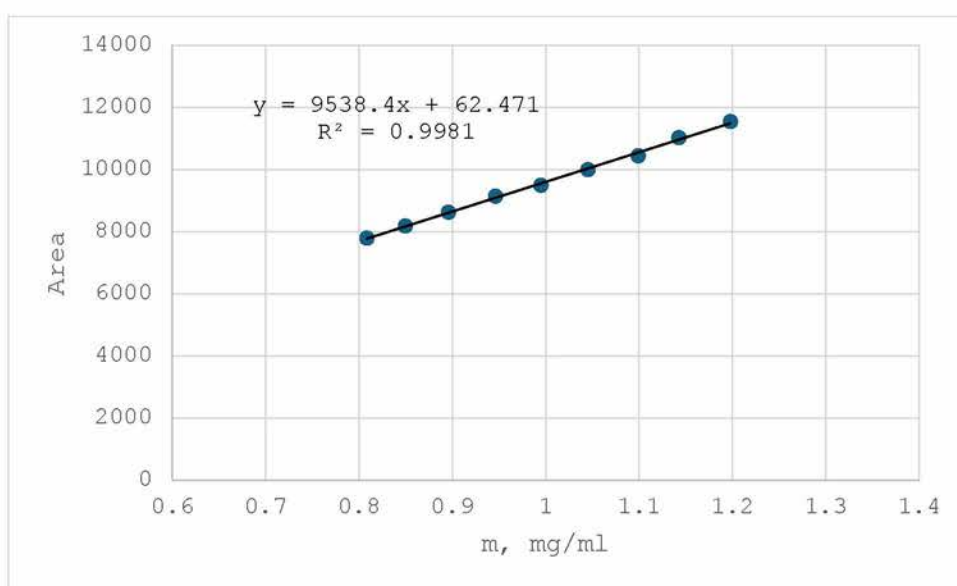


Рисунок 3.48 – Калібрувальна крива залежності площі піку сигналу ДМД від вмісту АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** в субстанції.

Для вивчення правильності розробленої методики було застосовано метод аналізу модельних розчинів на трьох рівнях концентрації, що охоплюють робочий діапазон: 80%, 100% та 120% від номінальної концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5**. Кожен рівень концентрації аналізувався у трьох незалежних серіях по одному повтору (всього 9 визначень). Правильність методики оцінювалась шляхом розрахунку відсотка вилучення для кожного з 9

визначень. Відсоток вилучення визначали як відношення середнього значення визначеної концентрації АФІ в модельних розчинах до їхнього теоретично доданого (номінального) значення. Результати вивчення наведені в табл. 3.13.

Таблиця 3.13 – Результати вивчення правильності ВЕРХ методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату **2.5** в субстанції

Серія	Розчин	Введено у модельну суміш (відносно концентрації у розчині порівнянн), %	Знайдено у модельній суміші (на основі результатів піків відносно концентрації у розчині порівнянн), %	Концентрація АФІ відносно введеної кількості, %	RSD, %
1	1	80	81.05	101.31	0.86
	2	80	79.68	99.60	
	3	80	80.52	100.65	
2	1	100	99.16	99.16	0.91
	2	100	99.96	99.96	
	3	100	100.98	100.98	
3	1	120	121.27	101.06	0.77
	2	120	120.05	100.04	
	3	120	119.45	99.54	
Середнє значення (між всіма концентраціями)				100.26	0.85

Середнє значення між серіями за всіма концентраціями становить 100.26%, що свідчить про високу відповідність отриманих результатів фактичному вмісту аналіту. Визначене відносне стандартне відхилення (RSD

= 0.85%) не перевищує допустимого значення згідно Державної Фармакопеї України (додаток 1) [103] та Європейської Фармакопеї [104] ($RSD_{\max} \leq 2\%$).

3.5.4 Оцінка впливу розробленої методики на навколишнє середовище за принципами «зеленої» аналітичної хімії

Розробка сучасних методів аналізу вимагає не лише високої точності та чутливості, але й мінімізації негативного впливу на здоров'я та навколишнє середовище. У контексті валідації та розробки методики ВЕРХ була застосована концепція «зеленої» аналітичної хімії. Основною метою стало підтвердження екологічної безпеки розробленого методу.

Для об'єктивної оцінки «зеленості» методики було використано два провідні метричні інструменти: Analytical GREEnness Metric (AGREE) та Green Analytical Procedure Index (GAPI). Ці інструменти дозволяють інтегрувати 12 принципів «зеленої» хімії у кількісні та візуальні показники. На рисунку 3.49 показані результати оцінки «зеленості» за методами AGREE та GAPI.

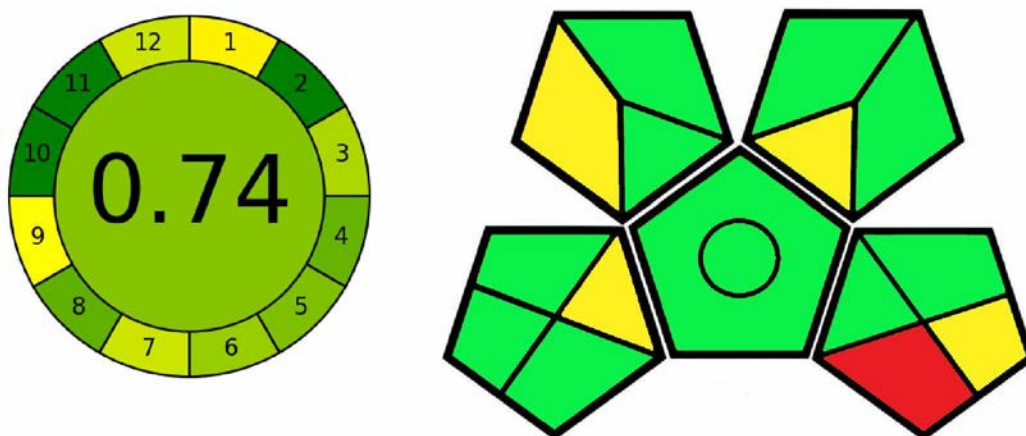


Рисунок 3.49 – Індикатори «зеленості» за методами Analytical GREEnness Metric (AGREE) та Green Analytical Procedure Index (GAPI).

За результатом комплексної оцінки екологічного профілю за методом AGREE (рис 3.49) хроматографічна методика має бал 0.74. Оцінка свідчить про достатній ступінь екологічної безпеки розробленої ВЕРХ-методики.

Індикатор методу GAPI (рис. 3.49) демонструє переважне забарвлення пентаграм у зелений, що вказує, що вся аналітична процедура, від пробопідготовки до аналізу, має незначний екологічний вплив. Потенційно «жовті» та «червоні» сектори, пов'язані з присутністю ацетонітрилу і електрозатратність системи ВЕРХ.

Загалом, розроблений метод за результатами тестувань є прийнятним щодо мінімізації використання небезпечних реагентів, генерації відходів, впливу на навколишнє середовище та організм людини.

ВИСНОВКИ

1. Підтверджено молекулярну масу, надані і обґрунтовані хроматографічні характеристики АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його потенційних домішок 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразиду, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонату, 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону та 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)оцтової кислоти, що забезпечило достовірну ідентифікацію аналітів і підтвердило структурну відповідність синтезованих речовин.

2. Досліджено вплив вмісту ацетонітрилу у рухомій фазі та встановлено його вплив на параметри хроматографічного утримання, ефективність та роздільну здатність піків, що дозволило визначити оптимальні умови елюювання аналітів.

3. Вивчено характеристику мас-спектрометричної фрагментації, що дало змогу ідентифікувати основні іонні фрагменти АФІ та супутніх домішок, що стало підґрунтям для створення надійної схеми структурної ідентифікації та підтвердження чистоти зразків.

4. Досліджено вплив температури колонки на показники утримання досліджуваних речовин. Розраховані значення ентальпії переносу для всіх досліджених речовин мають від’ємні значення, отже підвищення температури призводить до зменшення часу утримування аналітів і підвищення відтворюваності результатів.

5. Проведена валідація розробленої ВЕРХ методики кількісного визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату підтвердила її відповідність основним аналітичним критеріям: правильність, селективність, прецизійність, лінійність, межі виявлення та кількісного визначення. Отримані результати свідчать про високу надійність і відтворюваність методики.

6. Виконано оцінку екологічності методики відповідно до принципів «зеленої» аналітичної хімії. Аналіз показав, що методика є екологічно безпечною згідно методу AGREE та GAPI.

На основі результатів досліджень цього розділу було опубліковано 1 наукову статтю [130], 7 наукових тез [134-139, 156] та 1 патент на винахід [140].

РОЗДІЛ 4
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ
РОЗРОБЛЕНОЇ ВЕРХ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ АФІ НАТРІЙ 2-((4-АМІНО-5-ТІОФЕН-2-ІЛМЕТИЛ)-4*H*-1,2,4-ТРІАЗОЛ-3-ІЛ)ТІО)АЦЕТАТУ

4.1 Визначення ізотонічної концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в потенційній лікарській формі для парентерального застосування

Визначення осмоляльності розчинів активних фармацевтичних інгредієнтів є одним із ключових етапів під час розробки та дослідження лікарських форм, призначених для парентерального введення. Цей процес має важливе значення не лише з точки зору якісного контролю фармацевтичної продукції, а й для забезпечення її ефективності, безпечності та фізіологічної сумісності з організмом людини. Правильно встановлена ізотонічна концентрація є одним із головних параметрів при створенні препаратів для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного та інших видів ін'єкційного введення, оскільки саме вона запобігає пошкодженню клітинних мембран, подразненню тканин і розвитку больових реакцій у місці ін'єкції.

Виходячи з того, що вивчення фармакодинаміки перспективного оригінального лікарського засобу на основі АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату передбачає створення ін'єкційної лікарської форми, обговорюване питання є вкрай актуальним.

Основною метою даного підрозділу є обґрунтування складу 1% водного розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату для потенційного парентерального застосування. Для парентерального застосування розчин АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату повинен мати осмотичний тиск, максимально наближений до показників плазми крові, тобто бути ізотонічним.

Забезпечення ізотонічності є важливою умовою фармацевтичної розробки, адже від неї залежить не лише комфортність введення препарату, а також стабільність, біодоступність і сумісність із фізіологічними рідинами.

4.1.1 Матеріали, реактиви та параметри виконання дослідження визначення ізотонічної концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Дослідження осмоляльності 1% розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату здійснювали відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (стаття 2.2.35) із використанням криоскопічного методу. Методика базується на визначенні зниження температури кристалізації (депресії точки замерзання) 1% досліджуваного розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату з водою високої якості очищення (Q₃). Для порівняння також досліджували 0,9% розчин натрію хлориду, який застосовувався як ізотонічний еталон.

Субстанцію натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат передана кафедрою токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету д. фарм. н. Сафоновим А. А. Будову та чистоту субстанції підтверджено на кафедрі фізколоїдної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету проф. Каплаушенком А. Г. та д. фарм. н. Варинським Б. О. за допомогою ВЕРХ-ДМД/МС та, додатково, даними ¹H ЯМР-спектроскопії [110].

Розчин натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату приготовано у воді високої якості очищення (Q₃) з концентрацією 1%, що відповідає попередньо встановленій ефективній концентрації [110].

Воду високої чистоти (18 МΩ при 25 °С) отримували за допомогою системи очищення Direct Q 3UV (Millipore, Мольсайд, Франція). Для проведення досліджень додатково застосовували 0,9% розчин натрію хлориду, 100 мл (Labesfal, Португалія, серія № 18Т2102).

Вимірювання температури кристалізації проводили за допомогою високоточного термометра Бекмана типу ТЛ-1 (метрологічно повірений), що забезпечує точність визначення температури до $\pm 0,005$ °С. Такий рівень чутливості приладу дозволяє отримати достовірні дані щодо величини депресії точки замерзання, що є критично важливим для точного розрахунку осмоляльності та визначення ізотонічної концентрації досліджуваної сполуки.

4.1.2 Проведення дослідження визначення ізотонічної концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Осмоляльність є показником, що характеризує сумарний внесок усіх розчинених речовин у створення осмотичного тиску розчину, що виражається в осмолях на кілограм розчинника (осмоль/кг), однак у практичних вимірюваннях зазвичай застосовується одиниця міліосмоль на кілограм розчину (мОсмоль/кг). Визначення осмоляльності базується на вимірюванні зниження температури замерзання розчину відносно чистого розчинника.

Для встановлення ізотонічної концентрації було застосовано кріоскопічний метод відповідно до вимог ДФУ (пункт 2.2.35). Для дослідження використовували підготовлений 1% розчин натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, 0,9% розчин натрію хлориду та воду високої якості чистоти Q₃.

Депресію температури замерзання досліджуваних розчинів відносно температури замерзання води Q₃ визначали за допомогою термометра Бекмана ТЛ-1, який забезпечує високу точність вимірювань і дає змогу реєструвати навіть мінімальні відхилення температури за умовною шкалою.

Отримані результати вимірювання температури замерзання води високої очистки Q₃, 0,9% розчину натрію хлориду та 1% розчину натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату наведені в табл. 4.1-4.3. Під час експерименту фіксували момент утворення перших кристалів, уникаючи повного замерзання зразків.

Таблиця 4.1 – Результати експерименту та статистична обробка експериментальних даних для серії вимірювань температури кристалізації води високої якості очистки Q₃ за термометром Бекмана

№	$T_{\text{крисст}}$	$[x - x']$	$[x - x']^2$	$\sqrt{\frac{\sum_x (x - x')^2}{n(n - 1)}}$
1.	5,10	0,00	0,000000	0,003944
2.	5,10	0,00	0,000000	
3.	5,10	0,00	0,000000	
4.	5,09	-0,01	0,000100	
5.	5,12	0,02	0,000400	
6.	5,11	0,01	0,000100	
7.	5,10	0,00	0,000000	
8.	5,08	-0,02	0,000400	
9.	5,12	0,02	0,000400	
10.	5,10	0,00	0,000000	
$\bar{x}$	5,10		0,001400	

Таблиця 4.2 – Результати експерименту та статистична обробка експериментальних даних для серії вимірювань температури кристалізації 0,9% розчину NaCl за термометром Бекмана

№	$T_{\text{крист}}$	$[x - x']$	$[x - x']^2$	$\sqrt{\frac{\sum x(x - x')^2}{n(n - 1)}}$
1.	4,55	0,02	0,000400	0,009545
2.	4,53	0,00	0,000000	
3.	4,54	0,01	0,000100	
4.	4,50	-0,03	0,000900	
5.	4,49	-0,04	0,001600	
6.	4,57	0,04	0,001600	
7.	4,54	0,01	0,000100	
8.	4,58	0,05	0,002500	
9.	4,54	0,01	0,000100	
10.	4,50	-0,03	0,000900	
$\bar{x}$	4,53		0,008200	

Таблиця 4.3 – Результати експерименту та статистична обробка експериментальних даних для серії вимірювань температури кристалізації 1% розчину натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за термометром Бекмана

№	$T_{\text{крист}}$	$[x - x']$	$[x - x']^2$	$\sqrt{\frac{\sum x(x - x')^2}{n(n - 1)}}$
1.	4,93	0,02	0,000400	0,006992
2.	4,91	0,00	0,000000	
3.	4,92	0,01	0,000100	
4.	4,93	0,02	0,000400	
5.	4,90	-0,01	0,000100	
6.	4,92	0,01	0,000100	
7.	4,87	-0,04	0,001600	
8.	4,90	-0,01	0,000100	
9.	4,87	-0,04	0,001600	
10.	4,91	0,00	0,000000	
$\bar{x}$	4,91		0,004400	

де $T_{\text{крист}}$ - зафіксована температура, при якій у зразку з'являлися перші кристали;

$[x - x']$ - різниця між вимірним значенням і середнім арифметичним значенням усіх спостережень;

$[x - x']^2$ - квадрат відхилення;

$\sqrt{\frac{\sum x(x-x')^2}{n(n-1)}}$ - розрахунок стандартної похибки середнього значення;

Середні значення температури кристалізації ($\bar{x}$) для води високої якості очистки Q₃, 0,9% розчину натрій хлориду та 1% розчину натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату були розраховані з урахуванням статистичної обробки результатів за t-критерієм Стьюдента при кількості вимірювань ($n = 10$).

Встановлено, що депресія температури кристалізації 0,9% розчину натрію хлориду відносно високої якості очистки Q₃ становить 0,57 °C, тоді як для 1% розчину натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату це значення дорівнює 0,19 °C.

На підставі отриманих даних та проведених розрахунків визначено, що ізотонічна концентрація 1% розчину натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату становить:

$$C(\%) = \frac{0,57 \times 1,0}{0,19} = 3,0$$

Отже, 3,0 г натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату утворюють ізотонічний розчин об'ємом 100 мл. Необхідно визначити кількість натрію хлориду, яка забезпечить ізотонічність 1% розчину натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

Відомо, що 3,0 г натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-

тріазол-3-іл)тіо)ацетату відповідають 0,9 г натрію хлориду у 100 мл розчину, тоді як для 1,0 г цієї сполуки потрібно X г натрію хлориду:

$$X(\text{г}) = \frac{0,9 \times 1,0}{3,0} = 0,3$$

Таким чином встановлено, що для ізотонування 1% розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату необхідно додати 0,6 г натрію хлориду на 100 мл розчину (розраховано як 0,9 г – 0,3 г = 0,6 г). Розрахована кількість натрію хлориду забезпечує ізотонічність 1% розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, максимально наближаючи його осмотичний тиск до показників плазми крові.

4.2 Дослідження впливу стрес-факторів на стабільність субстанції та ін'єкційного розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Дослідження впливу стрес-факторів на АФІ є важливим етапом у процесі розробки та впровадження майбутнього лікарського засобу у фармацевтичне виробництво. Дане дослідження регламентується низкою нормативних документів, як у нас в Україні, так і в інших розвинених країнах і спрямоване на оцінку впливу різних фізико-хімічних чинників (термічна, окиснювальна, ультрафіолетова деградація, лужний та кислотний гідроліз, а також деградація при лабораторних умовах), що можуть виникати на етапах синтезу, зберігання або виробництва лікарських форм [103-105].

Основною метою проведення випробувань є дослідження стресової деградації субстанції та ін'єкційного 1% водного розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, виявлення потенційних напрямів деградації АФІ, а також підтвердження специфічності

аналітичної методики. Дослідження дозволяє провести оцінку чутливості до впливу факторів зовнішнього середовища.

З практичної точки зору, проведення дослідження впливу стрес-факторів є складовою підтвердження надійності та валідності аналітичної методики, особливо при розробці методу кількісного визначення за допомогою ВЕРХ або ВЕРХ-МС. Отримані дані дозволяють переконатися, що методика здатна розрізняти вихідну речовину від продуктів її деградації, що є критично важливим для забезпечення якості, ефективності та безпечності фармацевтичного препарату.

4.2.1 Матеріали, реактиви та параметри виконання дослідження впливу стрес-факторів на стабільність субстанції та ін'єкційного розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

При виконанні дослідження використана субстанція АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, що була передана кафедрою токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету д. фарм. н. Сафоновим А. А. Будову та чистоту субстанції підтверджено на кафедрі фізколоїдної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету проф. Каплаушенком А. Г. та д. фарм. н. Варинським Б. О. за допомогою ВЕРХ-ДМД/МС та, додатково, даними ¹H ЯМР-спектроскопії [110]. Також для вивчення факторів деградації використано потенційну лікарську форму, а саме 1% розчин натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в ампулах, склад якої визначений попередніми дослідженнями (підрозділ 4.1). Досліджувана лікарська форма передана кафедрою токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету д. фарм. н. Сафоновим А. А.

Реактиви та розчинники – CH₃CN для ВЕРХ класифікації Super Gradient (Avantor Performance Materials Poland S.A., Польща), HCOOH «For analysis»

(98%) (AppliChem GmbH, Німеччина), 3% розчин H_2O_2 (PC VIOLA LLC, Україна), 0.1 М розчин NaOH, 0.1 М розчин HCl, вода високої якості очистки (Q_3 , 18 М Ω , 25 °C). Для виготовлення води високої якості очистки використано Direct Q 3UV (Millipore, Мольсайд, Франція).

При дослідженні субстанції – 10 мг субстанції натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату розчиняли в 1 мл води високої якості очистки.

При дослідженні впливу УФ випромінювання використовували люмінісцентну ультрафіолетову лампу YF UV-9W (діапазон довгохвильового ультрафіолету із максимум випромінювання 365 нм).

Кількісний вміст АФІ контролювався методом високоефективної рідинної хроматографії, методика є запатентованою [140] (пріоритет належить Запорізькому державному медико-фармацевтичному університету). Хроматографічна система Agilent 1260 Infinity HPLC, діодно-матричний детектор та одноквадрупольний мас-спектрометричний детектор Agilent 6120. Колонка Zorbax SB-C18; 30 мм x 4,6 мм; 1,8 мкм. Рухома фаза складалась із води (0,1% HCOOH) та ацетонітрилу (0,1% HCOOH) (75:25). Швидкість потоку елюенту 0,4 мкл/хв. Довжина хвилі діодноматричного детектора 232 нм. Мас-спектрометр у режимі сканування при m/z 100-2000. Швидкість потоку газу осушувача (азот) складала 10 л/хв, тиск газу – 55 psi. Валідація даної методики описана в підрозділі 3.5 даної дисертаційної роботи.

Робочі розчини були виготовлені відповідно до вимог Державної фармакопеї України, розділ «Реактиви» [119].

4.2.2 Проведення дослідження впливу стрес-факторів на стабільність субстанції та ін'єкційного розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Процедура впливу стрес-факторів на стабільність лікарського засобу визначається «Настановою з виробництва готових лікарських засобів» (СТ-Н

МОЗ 42-3.4:2020), затвердженої наказом Міністерства охорони здоров'я України.

При проведенні дослідження стресової деградації субстанції, для встановлення кількісного вмісту АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, щоденно протягом 4 днів дії кожного стресового фактору відбирали зразки, готували відповідні розчини для введення і дослідження за допомогою ВЕРХ. Ін'єкційний розчин вводили в хроматографічну систему в нативному вигляді (без розведення). Відсотковий вміст взятий на основі звіту OpenLab CDS Software за сигналом діодно-матричного детектора при довжині хвилі 232 нм.

Деградація при лабораторних умовах: субстанцію та 1% розчин АФІ зберігали при кімнатній температурі в лабораторних умовах [141, 142].

Термічна деградація: субстанцію та 1% розчин АФІ зберігали в сухожаровій шафі при температурі 70°C [141, 142].

Окиснювальна деградація: 10 мг субстанції АФІ було розчинено в 1 мл 3% H₂O₂, при цьому досліджено вплив окиснювального агенту [141, 142]. Вплив окислювальної деградації для лікарської форми не досліджувався виходячи до того, що дослідження даного параметру для субстанції передбачає етап приготування розчину.

Лужний та кислотний гідроліз: для вивчення впливу лужного або кислотного середовища відповідно 10 мг субстанції АФІ було розчинено окремо в 1 мл 0.1 М NaOH та в 1 мл 0.1 М HCl [141, 142]. Вивчення означеного параметру для лікарської форми, аналогічно попередньому пункту.

Ультрафіолетова деградація: субстанцію та 1% розчин АФІ досліджено під впливом дії УФ випромінення [141, 142]. Об'єкти дослідження перемішували з періодичністю 4 години.

Результати визначення кількісного вмісту АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату після впливу факторів деградації наведено в табл. 4.4. Кількість АФІ в субстанції та лікарській формі до початку вивчення стресових факторів брали за 100%.

Таблиця 4.4 – Кількісний вміст АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при різних умовах деградації

Умови деградації	День експерименту				
	0	1	2	3	4
Лабораторні умови, субстанція	99,85	99,84	99,81	99,81	99,80
Лабораторні умови, 1% розчин	99,51	99,45	99,37	99,37	99,34
Сухожарова шафа 70°C, субстанція	99,70	99,68	99,65	99,61	99,59
Сухожарова шафа 70°C, 1% розчин	99,49	99,41	99,28	99,16	99,12
Пероксид водню 3%	99,53	90,12	82,76	75,32	70,84
Розчин NaOH 0.1 M	99,61	99,58	99,51	99,49	99,50
Розчин HCl 0.1 M	99,57	99,55	99,51	99,51	99,45
Вплив УФ випромінення, субстанція	99,35	99,34	99,12	99,11	99,09
Вплив УФ випромінення, 1% розчин	99,81	95,16	89,82	83,19	78,41

Деградація при лабораторних умовах: під час зберігання 1% розчину АФІ при кімнатній температурі в лабораторних умовах відсоток основної речовини майже не змінився, зміни від початкового відсоткового вмісту на момент початку експерименту і до його закінчення склали до 0,17%. На субстанцію зберігання при лабораторних умовах не вплинуло.

Термічна деградація: під впливом високої температури (70°C) 1% розчин АФІ розклався приблизно на 0,37%. На субстанцію термічна деградація протягом 4 днів майже не вплинула (до 0,1%).

Окиснювальна деградація: вплив 3% пероксиду водню протягом 4 днів призводить до зниження концентрації АФІ приблизно на 30% (рис. 4.1).

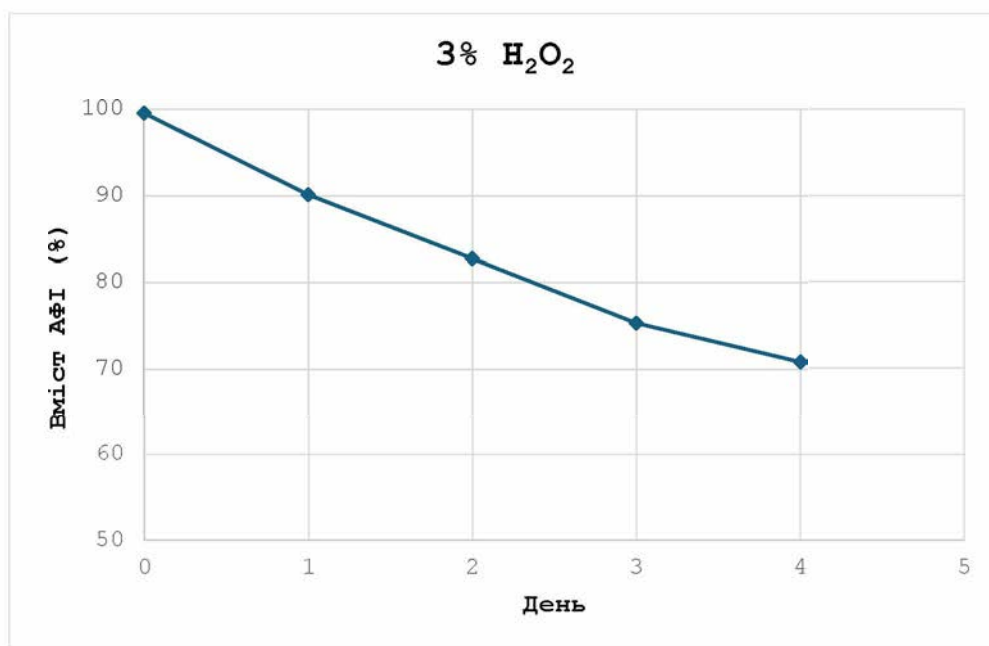


Рисунок 4.1 – Крива деградації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату під дією 3% пероксиду водню.

Лужний та кислотний гідроліз: під дією розчинів 0.1 М NaOH та 0.1 М HCl кількісний вміст АФІ протягом експерименту істотно не змінився (~0,1% в обох випадках).

Ультрафіолетова деградація: ультрафіолетове опромінення протягом 4-х днів призводить до розпаду 1% розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату більш ніж на 20% (рис. 4.2). У той же час вміст АФІ під час УФ опромінення субстанції майже не змінився.

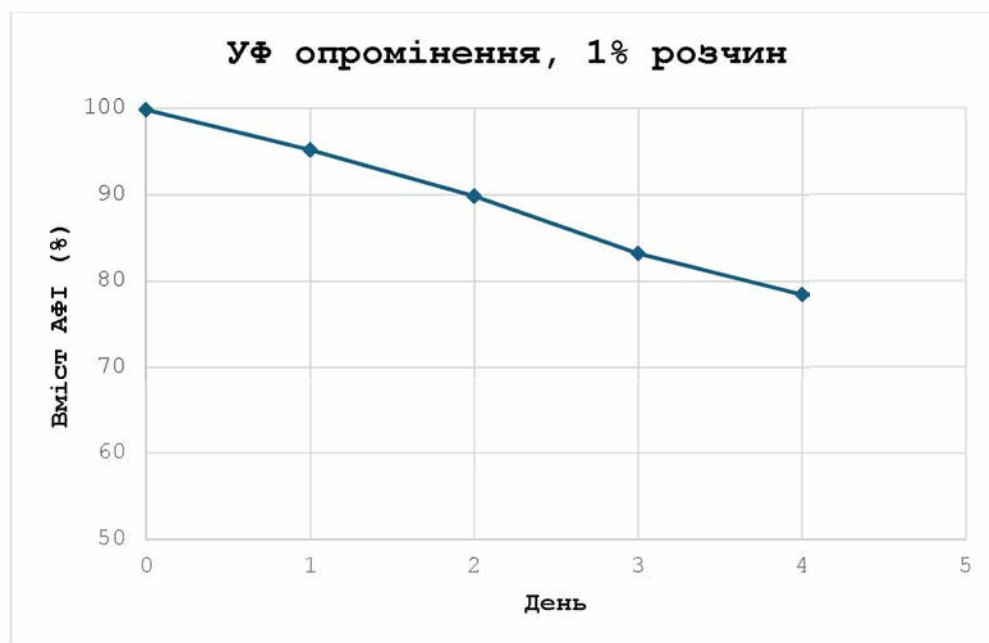


Рисунок 4.2 – Крива деградації 1% розчину натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату під дією ультрафіолетового опромінення.

4.3 Визначення стабільності для встановлення терміну придатності субстанції та лікарської форми на основі АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Визначення стабільності є основною характеристикою для встановлення терміну придатності субстанції та лікарської форми, отже є важливим етапом при розробці та впровадженні нового оригінального лікарського засобу, адже кожен розроблений лікарський препарат має бути максимально ефективним і безпечним для застосування протягом усього визначеного періоду. Дослідження стабільності проводиться як на стадії розробки, так і під час виробництва з метою забезпечення постійної якості продукції. Крім того стабільність є параметром, що підлягає обов'язковому контролю під час зберігання субстанції та лікарської форми. Ігнорування правил зберігання та терміну придатності лікарських засобів може призвести до змін у їх складі, що, у свою чергу, знижує терапевтичну ефективність препарату, викликає

непередбачувані побічні реакції або навіть отруєння. В окремих випадках неправильно збережені ліки можуть стати джерелом токсичних сполук, продуктів розкладу чи мікробіологічного забруднення, що становить серйозну загрозу для здоров'я пацієнта.

Основною метою дослідження є встановлення терміну придатності субстанції та лікарської форми на основі АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, що дозволяє гарантувати якість, безпечність і ефективність лікарського засобу протягом усього терміну його зберігання, а також визначення стабільності АФІ.

4.3.1 Матеріали, реактиви та параметри виконання дослідження стабільності для встановлення терміну придатності субстанції та лікарської форми на основі АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

При виконанні дослідження використана субстанція АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та 1% водний розчин АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату які передані кафедрою токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету д. фарм. н. Сафоновим А. А). Як було зазначено раніше, будову та чистоту субстанції підтверджено на кафедрі фізикоїдної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету проф. Каплаушенком А. Г. та д. фарм. н. Варинським Б. О. за допомогою ВЕРХ-ДМД/МС та, додатково, даними ¹Н ЯМР-спектроскопії [110].

Реактиви та розчинники – CH₃CN для ВЕРХ класифікації Super Gradient (Avantor Performance Materials Poland S.A., Польща), НСООН «For analysis» (98%) (AppliChem GmbH, Німеччина), 3% розчин H₂O₂ (PC VIOLA LLC, Україна), 0.1 М розчин NaOH, 0.1 М розчин HCl, вода високої якості очистки

(Q₃, 18 MΩ, 25 °C). Для виготовлення води високої якості очистки використано Direct Q 3UV (Millipore, Мольсайд, Франція).

При ВЕРХ-МС дослідженні зразків субстанції, 10 мг субстанції натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату розчиняли в 1 мл води високої якості очистки. Кількісний вміст АФІ контролювався методом високоефективної рідинної хроматографії, методика є запатентованою [140] (пріоритет належить Запорізькому державному медико-фармацевтичному університету). Хроматографічна система Agilent 1260 Infinity HPLC, діодно-матричний детектор та одноквадрупольний мас-спектрометричний детектор Agilent 6120. Колонка Zorbax SB-C18; 30 мм x 4,6 мм; 1,8 мкм. Рухома фаза складалась із води (0,1% HCOOH) та ацетонітрилу (0,1% HCOOH) (75:25). Швидкість потоку елюенту 0,4 мкл/хв. Довжина хвилі діодноматричного детектора 232 нм. Мас-спектрометр у режимі сканування при *m/z* 100-2000. Швидкість потоку газу осушувача (азот) складала 10 л/хв, тиск газу – 55 psi.

Робочі розчини були виготовлені відповідно до вимог Державної фармакопеї України, розділ «Реактиви» [119].

4.3.2 Проведення дослідження стабільності для встановлення терміну придатності субстанції та лікарської форми на основі АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Дослідження стабільності для визначення терміну придатності субстанції та лікарської форми на основі АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату проводили методом «прискореного старіння», суть якого полягає у витримці досліджуваного зразка лікарської форми за температури, яка перевищує середню кімнатну (~20°C) температуру зберігання.

Процедура встановлення терміну придатності лікарського засобу визначається «Настановою з виробництва готових лікарських засобів» (СТ-Н

МОЗ 42-3.4:2020), затвердженої наказом Міністерства охорони здоров'я України від 07 травня 2020 року № 1077.

Субстанція АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та 1% водний розчин (по 3 серії кожного під робочою назвою АСП-34) досліджено за умов впливу температури 40°C шляхом їх зберігання в сухожаровій шафі (зразки 1% розчину зберігали в запаяних ампулах по 10 мл зі скла марки НС-3) (рис. 4.3).



Рисунок 4.3 – Пакування субстанції та 1% водного розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при проведенні дослідження стабільності методом «прискореного старіння».

Зразки субстанції відбирали кожні 60 днів, готували для введення і досліджували за допомогою ВЕРХ (3 серії по 6 повторів кожний).

Аналогічним чином здійснювали аналіз 1% розчину АФІ. Контроль кількісного вмісту АФІ проводили на основі звіту OpenLab CDS Software за сигналом діодно-матричного детектора при довжині хвилі 232 нм. Експеримент продовжувався пів року, що в свою чергу, при зберіганні лікарської форми за кімнатної температури, відповідає 2 рокам терміну зберігання.

Таблиця 4.5 – Результати аналізу субстанції АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в процесі дослідження стабільності методом «прискореного старіння»

Серія	Термін експерименту	Еквівалентний термін зберігання	Показники якості		
			pH	Кількісний вміст діючої речовини в 1 мл	Зовнішній вигляд
A	60 днів	240 днів	7,0	0,01023	Порошок жовтуватого кольору
B			7,0	0,01038	
C			7,0	0,01028	
A	120 днів	480 днів	7,0	0,00987	Порошок жовтуватого кольору
B			7,0	0,00991	
C			7,0	0,00984	
A	180 днів	720 днів	7,0	0,00960	Порошок жовтуватого кольору
B			7,0	0,00968	
C			7,0	0,00961	

Результати дослідження стабільності субстанції та серій 1% водного розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату впродовж усього періоду експериментального зберігання систематизовано та узагальнено в табл. 4.5 і 4.6. На рис. 4.4-4.6. також

продемонстровані зміни в спектрі поглинання АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в УФ області.

Таблиця 4.6 – Результати аналізу 1% водного розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в процесі дослідження стабільності методом «прискореного старіння»

Серія	Термін експерименту	Еквівалентний термін зберігання	Показники якості		
			pH	Кількісний вміст діючої речовини в 1 мл	Зовнішній вигляд
A	60 днів	240 днів	7,0	0,01056	Прозора рідина жовтуватого кольору
B			7,0	0,01082	
C			7,0	0,0110	
A	120 днів	480 днів	7,0	0,00991	Прозора рідина жовтуватого кольору
B			7,0	0,00997	
C			7,0	0,01014	
A	180 днів	720 днів	7,1	0,00952	Прозора рідина жовтуватого кольору
B			7,0	0,00943	
C			7,0	0,00963	

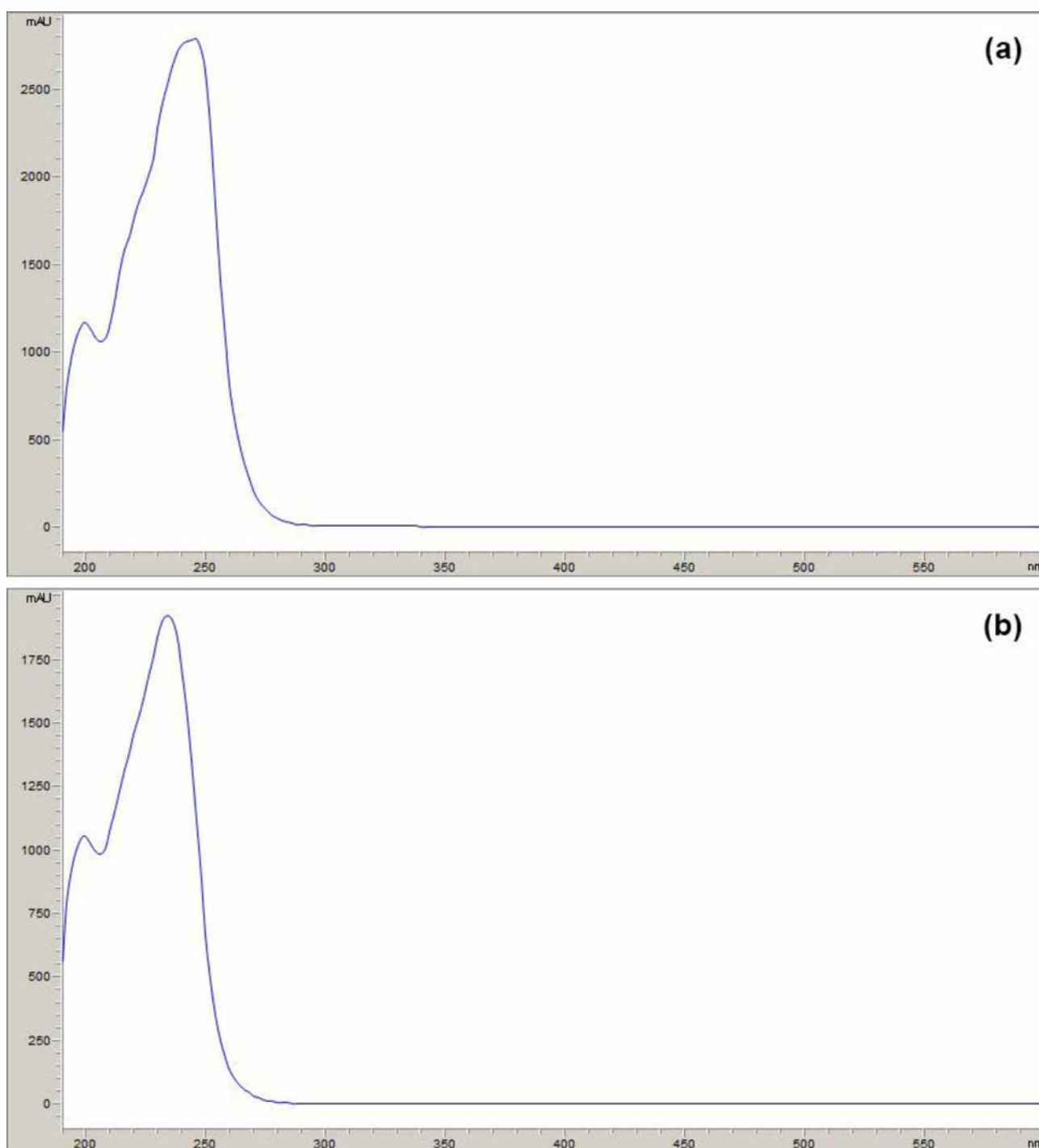


Рисунок 4.4 – Спектр поглинання натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в УФ області після 60 днів зберігання при температурі 40°C; а – спектр 1% водного розчину; б – спектр субстанції АФІ.

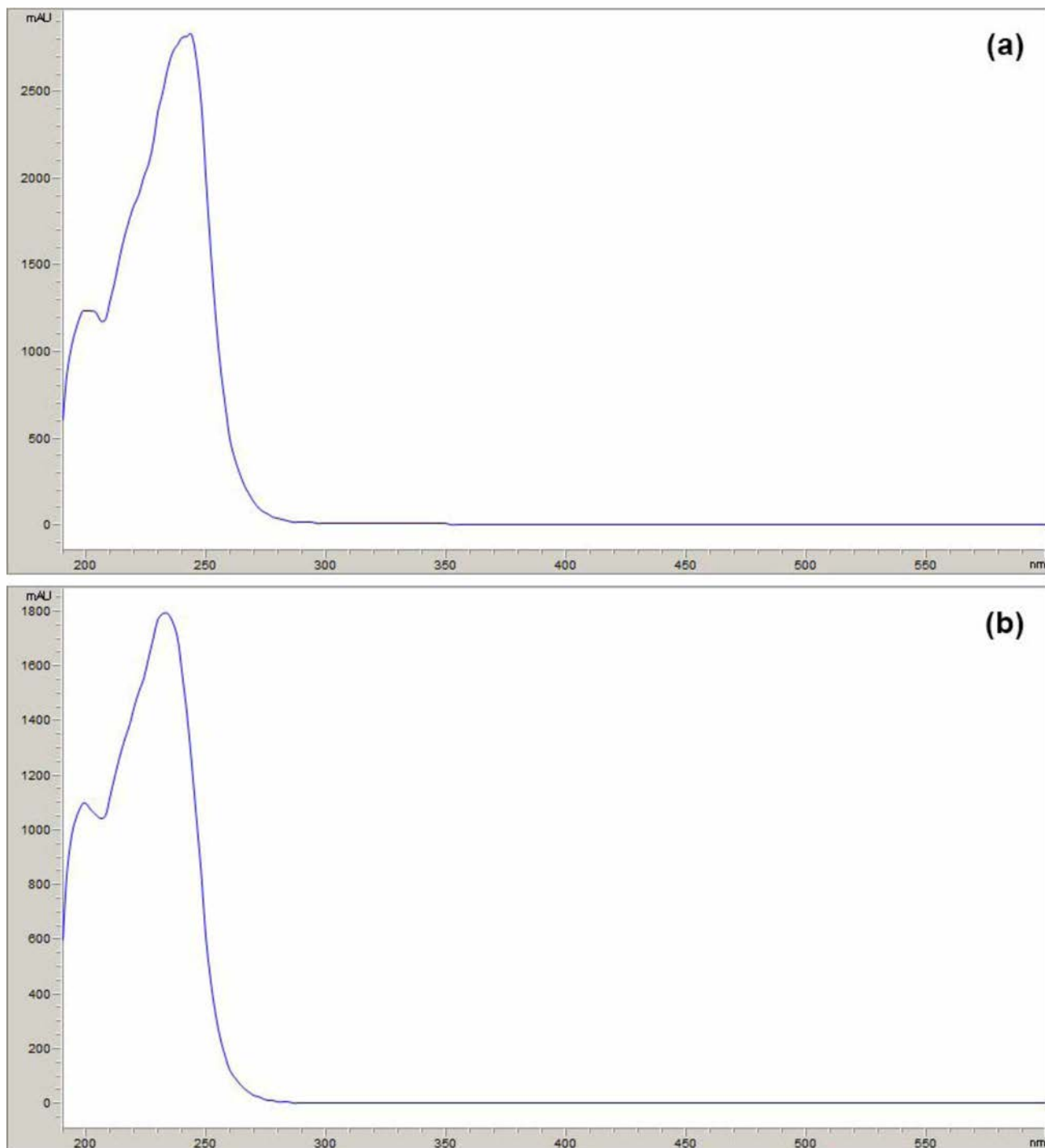


Рисунок 4.5 – Спектр поглинання натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в УФ області після 120 днів зберігання при температурі 40°C; а – спектр 1% водного розчину; б – спектр субстанції АФІ.

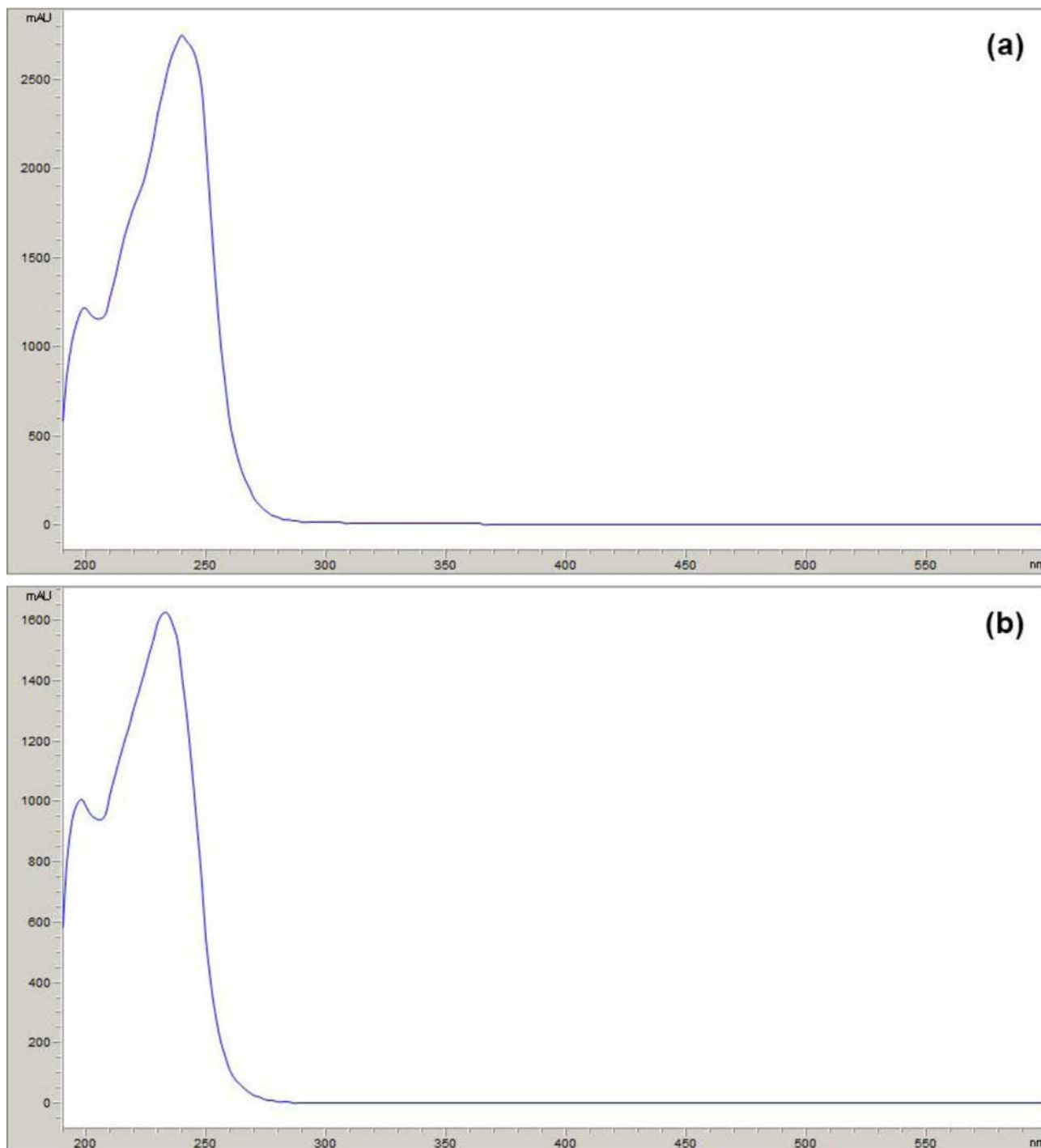


Рисунок 4.6 – Спектр поглинання натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в УФ області після 180 днів зберігання при температурі 40°C; а – спектр 1% водного розчину; б – спектр субстанції АФІ.

Термін придатності (C) при температурі зберігання ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) прямо пропорційний експериментальному терміну придатності (C_e) при підвищеній температурі зберігання (40°C) і має наступну залежність:

$$C = C_e \times K$$

Коефіцієнт відповідності (K) $t^{\circ}_{\text{експ.}} - t^{\circ}_{\text{збер.}} = 20^{\circ}\text{C}$ складає 4.

Аналіз за допомогою ВЕРХ дозволив встановити, що в процесі «прискореного старіння» при встановленій температурі в 40°C субстанція та 1% водний розчин АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату через 180 днів експерименту не зазнали змін в кількісному складі. Для всіх досліджуваних серій рівень рН розчину АФІ та візуальний стан також змін не зазнали. Можна зробити висновок про стабільність означених об'єктів при зберіганні.

Визначення терміну придатності:

$$C = 180 \times 4 = 720 \text{ днів } (\sim 2 \text{ роки})$$

Таким чином, встановлено, що після завершення випробувань стабільності субстанції та ЛФ в ході експериментального зберігання під впливом температури (40°C) методом «прискореного старіння» 1% водний розчин АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його субстанція відповідають терміну придатності строком не менше 2 років (в ампулах при кімнатній/номінальній температурі 20°C).

Варто відмітити, що паралельно з дослідженням стабільності методом «прискореного старіння» зразки субстанції та 1% водного розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату зберігались також при кімнатній температурі. Змін у кількісному складі та інших показниках якості не спостерігається. Визначення терміну придатності субстанції та 1% водного розчину АФІ при звичайній температурі зберігання продовжуються.

4.4 Дослідження фармакокінетики та метаболізму натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Дослідження фармакокінетики та шляхів метаболізму АФІ є одним із ключових етапів у процесі створення, розробки та контролю ефективності лікарських засобів. Результати дослідження дозволяють встановити закономірності всмоктування, розподілу, біотрансформації та виведення сполук з організму, що визначає їхню терапевтичну активність, тривалість дії та рівень безпечності. Знання особливостей фармакокінетичних параметрів - таких як біодоступність та період напіввиведення - дає змогу не лише оптимізувати дозування препарату, а й прогнозувати його поведінку за різних шляхів введення. Це дослідження набуло особливої уваги за останні роки, особливо в розвинених країнах з огляду на перехід до персоніфікованої медицини. Крім того, варто додати, що розроблені методики визначення АФІ та їх метаболітів в подальшому є вкрай необхідними для визначення фармакокінетичних та метаболічних параметрів при проведенні клінічних випробувань.

Аналіз метаболічних шляхів АФІ має важливе значення для виявлення можливих активних або токсичних метаболітів, встановлення механізмів їх утворення та оцінки потенційних ризиків взаємодії з іншими лікарськими засобами.

Комплексне дослідження фармакокінетики та метаболізму є необхідною умовою для обґрунтованого вибору дозування, режиму застосування та формування профілю безпеки лікарського засобу. У контексті сучасної фармацевтичної науки такі дослідження є важливим і невід'ємним інструментом підвищення якості, ефективності та безпечності лікарських препаратів, що зрештою сприяє покращенню результатів фармакотерапії та загального рівня медичного обслуговування.

4.4.1 Параметри виконання дослідження фармакокінетики та метаболізму АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

При виконанні дослідження використана кров дослідних щурів лінії «Вістар», яким вводили обговорюваний активний фармацевтичний інгредієнт та стандартний робочий зразок відповідного АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, які були передані кафедрою токсикологічної та неорганічної хімії (д. фарм. н., доцент Сафонов А. А.) Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Будову та чистоту стандартного робочого зразку підтверджено даними ¹H ЯМР-спектроскопії, а кількість основної речовини, натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату підтверджена методом неводного потенціометричного титрування [110].

Усі етапи дослідження проводилися відповідно до Директиви Європейського Парламенту та Ради 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 року «Про захист тварин, що використовуються для наукових цілей» [143].

В якості розчинників та реагентів використано ацетонітрил (CH₃CN) для ВЕРХ класифікації Super Gradient («Avantor Performance Materials Poland S.A.», Польща), мурашина кислота (HCOOH) класифікації «For analysis» (98%) («AppliChem GmbH», Німеччина) та високоочищена вода (Q₃, 18 MΩ, 25 °C).

Аналіз проводили за допомогою ВЕРХ-ДМД (Agilent 1260 Infinity HPLC System), що включає дегазатор, бінарний насос, автосамплер, термостат для колонки та діодно-матричний детектор. Контроль, управління процесом аналізу і обробку даних виконували за допомогою ліцензійного програмного забезпечення Agilent OpenLAB Software CDS.

Для вивчення фармакокінетичних параметрів концентрації АФІ використовували метод ВЕРХ. За основу, для відпрацювання методики визначення кількісного вмісту натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові використана вже відома та

відпрацьована методика [140]. ВЕРХ дослідження проводили в ізократичному режимі. Використовували рухоми фазу А (H_2O з 0,1% HCOOH) і Б (CH_3CN з 0,1% HCOOH). Співвідношення рухомої фази А до Б – 75% до 25% (за об'ємом). Використовували хроматографічну колонку Zorbax SB-C18 (30 мм $\times$ 4,6 мм, 1,8 мкм). Температура колонки - 40°C. Швидкість потоку елюенту - 0,4 мл/хв, об'єм інжекції - 2 мкл. Діодно-матричний детектор працював на довжині хвилі 232 нм. Для дослідження фармакокінетики об'єм інжекції становив 2 мкл. При визначенні метаболітів використовувався підвищений об'єм інжекції, що становив 10 мкл. Це пояснюється тим, що концентрація метаболітів в пробах є значно нижчою за стандартні умови.

Крім того виявлення та, особливо ідентифікація метаболітів вимагає їх детектування, задля виконання означеної мети використовували мас-детектор. Отже, для дослідження додатково використовували одноквадрупольний мас-спектрометр з електроспрей-іонізацією (ESI) Agilent 6120. Режим сканування стандартний, в діапазоні m/z 100-1000. У режимі SIM для фармакокінетичного дослідження використовувалося значення m/z 271. Напруга на фрагментаторі становила 10 В. Температура сушильного газу - 300°C. Тиск розпилювача - 40 psi. Швидкість потоку газу - 10 л/хв.

Для приготування рухомої фази А 1 мл HCOOH вносять до мірної колби (об'ємом 1000 мл) і розчиняють у 100 мл води високої очистки, після чого тим самим розчинником доводять об'єм розчину до позначки та ретельно перемішують.

Для приготування рухомої фази Б 1 мл HCOOH вносять до мірної колби (об'ємом 1000 мл) і розчиняють у 100 мл ацетонітрилу, після чого тим самим розчинником доводять об'єм розчину до позначки та ретельно перемішують.

За допомогою онлайн-сервісу BioTransformer 3.0 [112] для пошуку метаболітів проводили прогноз біотрансформації.

4.4.2 Проведення дослідження фармакокінетики натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Для дослідження фармакокінетичних параметрів використовували 7 груп тварин, 6-ти з яких вводили АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат у дозі 100 мг/кг [144] (вводили перорально у формі 1% ізотонованого водного розчину за допомогою жорсткого зонду), а 1 група використовувалась у якості контролю. Згідно з біоетичними стандартами [145] кількість щурів у кожній із 7-ми груп становила 4 особи. Відбір зразків крові у тварин здійснювали протягом 24 годин з інтервалами 0,25, 0,75, 2,5, 7,5, 13,5 та 24 години. Попередній розрахунок часових точок визначення концентрації АФІ проводили на основі логарифмічного розподілу ($\log_{10}$ від 24) з інтервалом 0,5. У тварин контрольної групи забір крові здійснювали одноразово. Отримані зразки крові піддавали центрифугуванню при швидкості 3000 об/хв, після чого відокремлену плазму використовували для подальшого визначення концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат методом ВЕРХ.

Для оцінювання фармакокінетичних характеристик АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату розраховано низку основних параметрів, що описують процеси абсорбції, розподілу та елімінації сполуки. Зокрема, визначали площу під фармакокінетичною кривою «концентрація-час» (AUC), яка відображає загальну експозицію препарату в організмі. Загальний кліренс (Cl) обчислювали як відношення введеної дози (D) до значення AUC, що характеризує швидкість елімінації препарату з одиниці об'єму біорідини. Константа елімінації (Kel) визначалася за нахилом термінальної ділянки фармакокінетичної кривої та описує швидкість зниження концентрації речовини у плазмі крові на пізніх етапах виведення. Об'єм розподілу (Vd) характеризує гіпотетичний об'єм, у якому препарат був би рівномірно розподілений при тій самій концентрації, що спостерігається в плазмі. Період напіввиведення ($T_{1/2}$) визначали як час, необхідний для зниження концентрації досліджуваної речовини у плазмі вдвічі.

Отримані дані мали нормальний розподіл, тому для статистичної обробки результатів застосовували непараметричний метод Крускала-Уолліса [146]. Відповідні розраховані параметри подано в табл. 4.8.

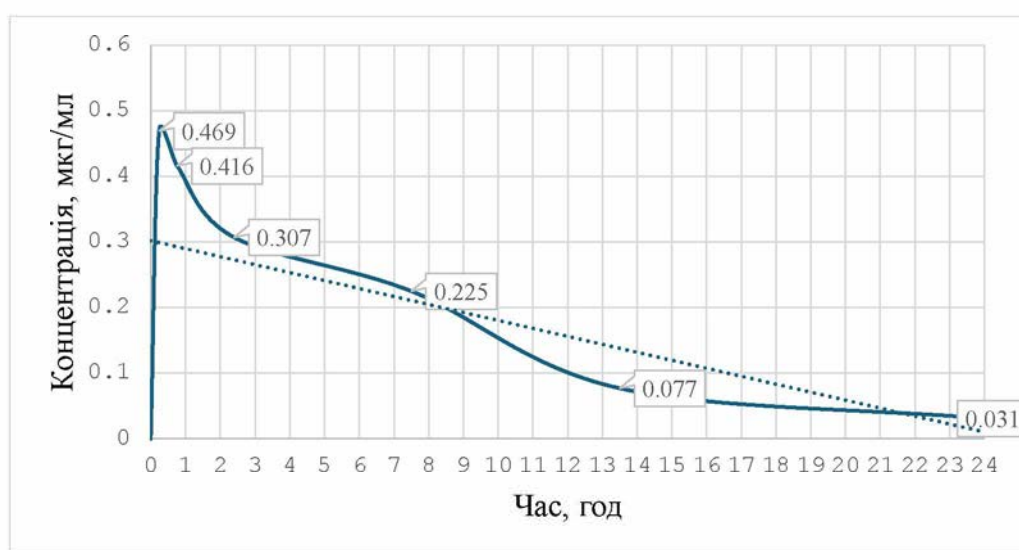
У процесі дослідження були розраховані середні арифметичні значення концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у зразках плазми крові експериментальних тварин. Встановлено, що максимальна концентрація досліджуваної сполуки у сироватці крові спостерігалася через 15 хвилин після введення препарату. У цей момент середній показник концентрації становив 0,469 мкг/мл (табл. 4.7). Надалі спостерігалось поступове зниження вмісту АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у плазмі, що є закономірним відображенням процесів його розподілу та елімінації з організму.

Таблиця 4.7 – Концентрація АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у зразках плазми крові експериментальних тварин

Час (год)	$\lg_{10}$ (год)	C, мкг/мл, середнє $\pm$ S
24	1.38	0.031 $\pm$ 0.00359
13.50	1.13	0.077 $\pm$ 0.00294
7.5	0.88	0.225 $\pm$ 0.0025
2.5	0.38	0.307 $\pm$ 0.00258
0.75	-0.12	0.416 $\pm$ 0.00419
0.25	-0.62	0.469 $\pm$ 0.00288

Аналіз даних, наведених у табл. 4.7 та на рис. 4.7, свідчить, що середнє арифметичне значення концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у плазмі крові протягом 24 годин зменшується приблизно у 15 разів порівняно з початковим значенням.

Динаміка зниження концентрації має моноекспоненційний характер, що вказує на пропорційну швидкість процесу розподілу та елімінації досліджуваної сполуки. Найнижчий рівень концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату було зафіксовано через 24 години після введення препарату. Подальший моніторинг концентрацій є недоцільним, оскільки вміст АФІ у плазмі на цьому етапі перевищує поріг зниження більш ніж у десять разів порівняно з раніше встановленою ефективною концентрацією.



Примітки: — - рівень концентрації; - - - - - середнє значення концентрації.

Рисунок 4.7 – Залежність концентрації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в крові від часу.

Основні фармакокінетичні параметри АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату були визначені на основі розрахунку за стандартними формулами, результати яких наведено в табл. 4.8. Площа під фармакокінетичною кривою «концентрація-час» (AUC) є інтегральним показником, що відображає ступінь системної експозиції препарату та використовується для оцінки його біодоступності - тобто кількості лікарської речовини, яка досягає системного кровообігу та

потенційного місця дії. Для перорального введення AUC становила 3,7088 мкг·год/мл.

У цьому дослідженні препарат вводили експериментальним тваринам перорально виходячи до того, що вивчається питання створення перспективної пероральної лікарської форми, крім того внутрішньоочеревинне введення тваринам, яке відповідає парентеральному введенню для людей, аналогічних за будовою АФІ є дослідженим [52, 78]. Також отримане значення AUC може бути використане для подальшого порівняння з показниками при внутрішньовенному введенні з метою визначення абсолютної біодоступності.

Константа елімінації ($K_{el} = 0,1143 \text{ год}^{-1}$), що характеризує швидкість виведення речовини з організму, є важливим параметром для розрахунку періоду напіввиведення ($T_{1/2}$). Отримане значення періоду напіввиведення ($T_{1/2} = 6,06 \text{ год}$) свідчить про відносно помірну швидкість елімінації сполуки з організму, що може бути характерним для речовин із середньою тривалістю фармакологічної дії.

Таблиця 4.8 – Основні фармакокінетичні параметри при застосуванні АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Індикатор	Формула розрахунку	Значення
1	2	3
AUC	$AUC = \frac{C_1}{2} * \Delta t_1 + \frac{C_1+C_2}{2} * \Delta t_2 + \frac{C_2+C_3}{2} * \Delta t_3 + \dots + AUC_{last},$	3,7088 мкг·год /мл
AUC _{last}	$AUC_{last} = \frac{C_{last}}{K_{el}}$	0,2711
$\ln(C_{max}/C_{last})$	$\ln(C_{max}/C_{last})$	2,7166

Продовження таблиці 4.8

1	2	3
Kel	$Kel = \frac{\ln \frac{C_{max}}{C_{last}}}{T_{last} - T_{max}} (h^{-1}),$ C_{max} та T_{max} - максимально визначена концентрація та час її визначення; C_{last} та T_{last} - концентрація останнього прийому та час дослідження.	0,1143 год ⁻¹
$T_{1/2}$	$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{Kel} (\text{год})$	6,0624 год
cl	$cl = \frac{D}{AUC} (\text{мл/год})$	26,9629 мл/год
Vd	$Vd = \frac{cl}{Kel} (\text{мл})$	235,8223 л/кг

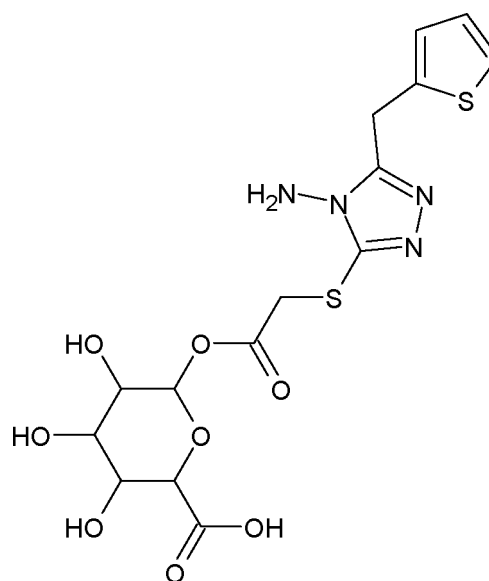
4.4.3 Проведення дослідження метаболізму АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Прогноз біотрансформації для пошуку метаболітів АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату проводився за допомогою онлайн-сервісу BioTransformer 3.0. [112]. У межах прогнозу було здійснено хеометричний пошук значних значень m/z , що можуть відповідати передбачуваним метаболітам у мас-спектрометричних даних проведеного дослідження. Спочатку мас-спектрометричні дані фармакокінетичних зразків порівнювали з калібрувальними зразками, підготовленими на основі плазми крові, в якій немає метаболітів АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, на основі часткового методу найменших квадратів для дискримінантного аналізу (PLS DA).

Нативна сполука є натрієвою сіллю карбонової кислоти, що містить аміногрупу. При потраплянні в організм натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-

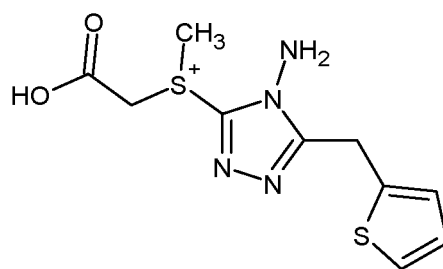
ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат дисоціює на натрієвий катіон і аніон 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)оцтової кислоти. Далі синтетична амінокислота може піддаватися як стандартним процесам метаболізму амінокислот (дезамінуванню та декарбоксилуванню), так і характерним процесам метаболізму сполук, що містять азот (відновлення або окиснення, ацилювання або метилювання) [147, 148]. Оцінка наявності метаболітів проводилася паралельно з визначенням фармакокінетичних параметрів для всіх груп дослідних тварин. Отримані результати хромато-мас-спектрометричного визначення порівнювалися з даними, отриманими від контрольної групи (якій не вводили АФІ).

Результатів для першої фази біотрансформації не було отримано. Згідно з другою фазою біотрансформації, було передбачено наступні можливі продукти метаболізму. На рисунках показано моноізотопну масу непротонованих сполук. Першою представленою реакцією є О-глюкуронування аліфатичної кислоти (рис. 4.8), потім утворення тіоефіру через S-метилювання (рис. 4.9), можливе утворення гліцинового кон'юганту (рис. 4.10) та на основі набору ферментів спостерігається кон'югація карнітину (рис 4.11).



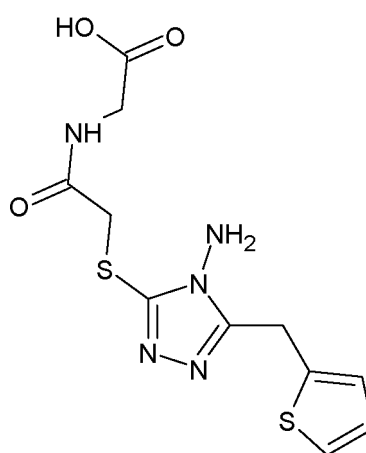
Monoisotopic Mass: 446.056604 Da

Рисунок 4.8 – Можливий метаболіт у наслідку реакції О-глюкуронування аліфатичної кислоти.



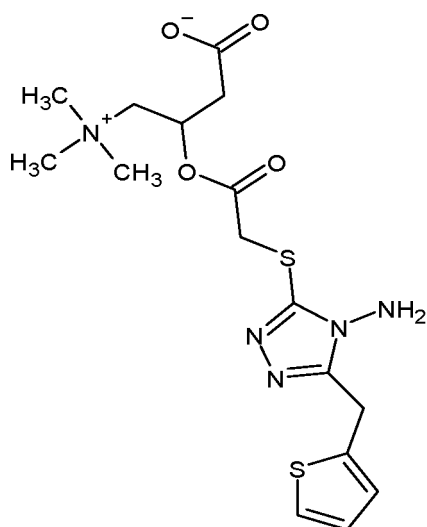
Monoisotopic Mass: 285.047442 Da

Рисунок 4.9 – Можливий метаболіт у наслідку реакції утворення тіоефіру через S-метилування.



Monoisotopic Mass: 327.045979 Da

Рисунок 4.10 – Можливий метаболіт у наслідку реакції кон'югації з гліцином.



Monoisotopic Mass: 413.119144 Da

Рисунок 4.11 – Можливий метаболіт у наслідку реакції кон'югації з карнітином.

На відміну від контрольної групи, під час хроматографічного дослідження плазми крові щурів, яким вводили АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат, було зафіксовано наявність сполуки з піком на 0,752 хв (328,0 m/z) (рис. 4.12). Аналіз піка псевдомолекулярного йону з масою 328,0 m/z, зафіксованого на 0,752 хв, свідчить про можливе утворення кон'югату з гліцином, що відповідає структурі, передбаченій у BioTransformer (рис. 4.10).

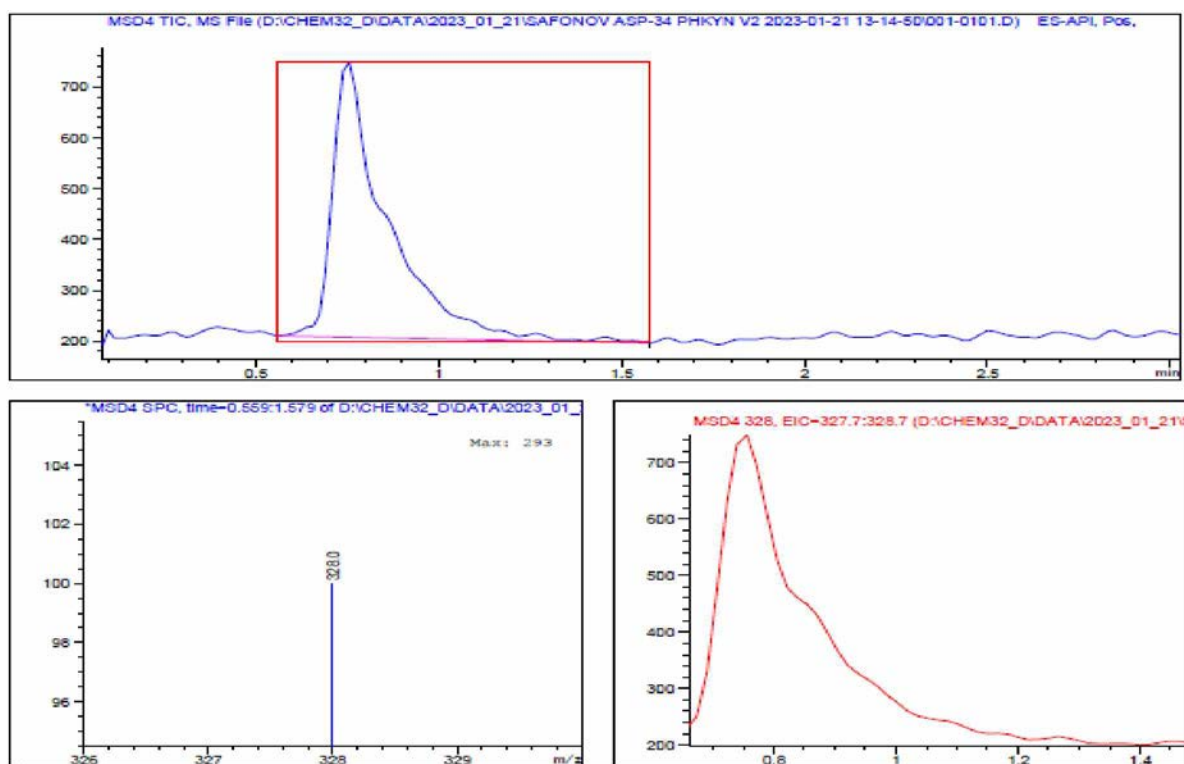


Рисунок 4.12 – Хроматограма та мас-спектр плазми тварин яким вводили АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (час утримання 0,752 хв).

Наступним етапом було хемометричне пошукове дослідження значущих відношень маси до заряду, що відповідають передбаченим метаболітам на основі даних "Прогнозування метаболізму" сервісу BioTransformer 3.0. Деконволюція значень m/z, отриманих під час фармакокінетичного аналізу,

була проведена за допомогою програмного забезпечення MZmine 3.0 [113]. Узагальнені та оброблені дані мас-спектрометрії з фармакокінетичних зразків порівнювались з калібрувальними зразками, які готувались за допомогою плазми крові без метаболітів АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, на основі аналізу за методом часткової найменшої квадратної дискримінантної аналітики (PLS-DA) з використанням висновків з онлайн-сервісу аналізу метаболомних даних MetaboAnalyst 6.0 [114].

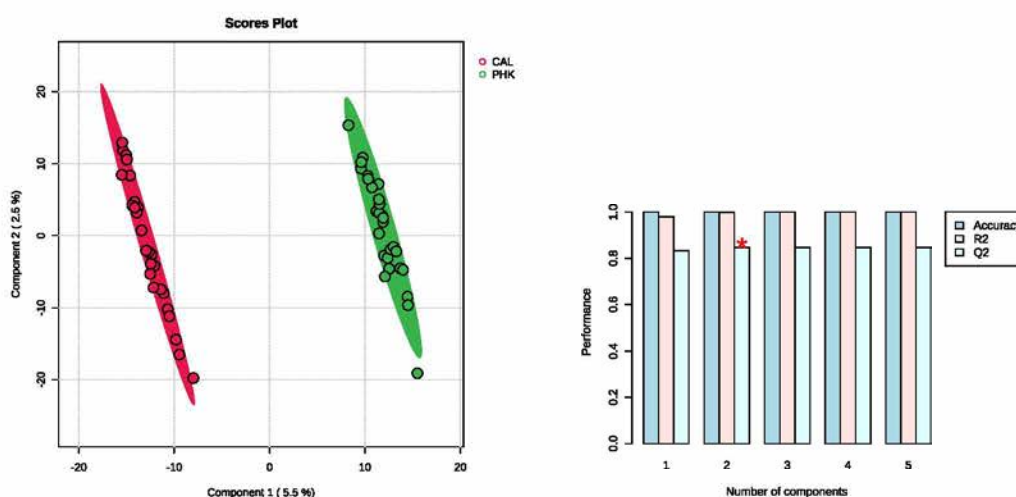


Рисунок 4.13 – **(а)** PLS DA групи фармакокінетичних та калібрувальних даних **(б)** оцінка якості моделі PLS DA.

Аналіз (рис. 4.13) показує суттєву різницю між фармакокінетичними та калібрувальними зразками плазми, що зумовлено наявністю метаболітів оригінальної речовини, а також зміною метаболізму в організмі щурів під впливом тестової речовини.

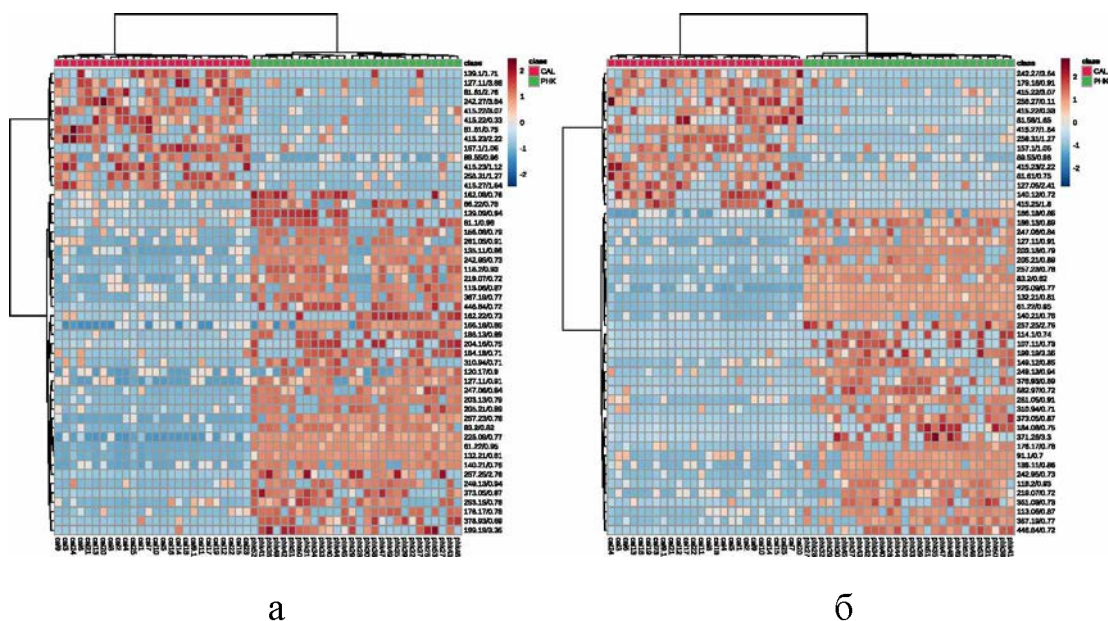


Рисунок 4.14 – Теплові карти на основі (а) PLS DA VIP Score та (б) t-test.

Аналіз теплових карт (рис. 4.14) з висновків MetaboAnalyst 6.0 в обох випадках (PLS DA VIP Score та t-тест) показує важливий пік (m/z 446,84 з часом утримання 0,72). У межах похибки мас-спектрометра (0,2 m/z) це відповідає 447 ($M+H^+$). Таким чином, це підтверджує наявність О-глюкуроніду як метаболіту. Наявність різниці в інших m/z може бути пов'язана з метаболічними змінами в організмі щурів.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою криоскопічного методу визначено депресію температури кристалізації води, розчинів NaCl (0,9%) і АФІ за результатом чого встановлено ізотонічну концентрацію АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Розраховано необхідну кількість натрій хлориду для ізотонування 1% розчину для парентерального застосування АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Для приготування 100 мл 1% розчину, ізотонічного плазмі крові, необхідно додати 0,6 г натрію хлориду.

2. Проведено дослідження стабільності субстанції та 1% розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату під впливом стрес факторів (лабораторні умови зберігання, підвищена температура, кислотний та лужний гідроліз, окиснення та ультрафіолетове опромінення). Встановлено, що субстанція є стабільною до термічного, гідролітичного та фотолітичного впливу, однак продемонструвала значну чутливість до окиснювальної деградації, а 1% розчин АФІ показав відносну стабільність при зберіганні та термічному нагріванні, але виявився високочутливим до фотодеградації (впливу УФ-опромінення). Виявлено, що кислотний та лужний гідроліз не є суттєвими факторами деградації для АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

3. Методом «прискореного старіння» проведено дослідження стабільності для встановлення терміну придатності субстанції та 1% розчину АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Встановлено, що протягом усього періоду експерименту субстанція та 1% розчин зберегли стабільність і відповідали встановленим показникам якості. На основі отриманих даних розраховано та обґрунтовано прогнозований термін придатності для субстанції та 1% водного розчину, який становить 2 роки (при зберіганні за кімнатної температури). Результати паралельного дослідження стабільності при кімнатній температурі, що триває, підтверджують отримані дані.

4. Проведено дослідження фармакокінетики нового АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату на щурах після одноразового перорального введення. Встановлено, що досліджувана сполука швидко всмоктується зі шлунково-кишкового тракту, досягаючи максимальної концентрації в плазмі крові за короткий проміжок часу (15 хв). Визначено, що процес елімінації речовини з організму має моноекспоненційний характер, що свідчить про пропорційну швидкість її розподілу та виведення. Розраховано основні фармакокінетичні параметри, зокрема площу під кривою «концентрація-час» (AUC), константу елімінації,

кліренс та об'єм розподілу. Обчислений період напіввиведення ($T_{1/2}$) свідчить про помірну швидкість елімінації сполуки, що дозволяє прогнозувати середню тривалість її фармакологічної дії в організмі.

5. Проведено *in silico* прогнозування шляхів біотрансформації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Здійснено експериментальну перевірку прогнозованих метаболітів у зразках плазми крові щурів, які отримували АФІ, методом ВЕРХ-МС. Хромато-мас-спектрометричний аналіз підтвердив наявність у плазмі крові дослідних тварин (на відміну від контрольної групи) щонайменше двох основних метаболітів, що утворилися внаслідок реакцій кон'югації. За допомогою хемометричного аналізу даних, отриманих із сервісу MetaboAnalyst 6.0, підтверджено наявність метаболітів О-глюкуроніду та гліцинового кон'югату, що збігається з *in silico* прогнозом. Статистичний аналіз чітко продемонстрував суттєву різницю в метаболомних профілях між калібрувальними зразками та зразками плазми, отриманими після введення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, що підтверджує факт метаболізму сполуки.

На основі результатів досліджень цього розділу було опубліковано 3 наукові статті [149-151] та 5 наукових тез [152-156].

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно з провідними світовими тенденціями розвитку фармацевтичної науки та практики, представлено вирішення актуальної проблеми сучасної фармації, а саме наукове обґрунтування, розроблення та впровадження у практику сучасних аналітичних підходів на основі ВЕРХ/ВЕРХ-ДМД-МС методів, зокрема проведення аналітичного супроводу АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції та потенційній лікарській формі, в тому числі при синтезі, зберіганні, а також вивченні поведінки в живому організмі.

1. Підтверджено молекулярну масу та структурну ідентичність АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та проміжні продукти в синтезі, такі як 2-(тіофен-2-іл)ацетогідразид, калій 2-(2-(тіофен-2-іл)ацетил)гідразин-1-карбодіонат, 4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон, що є потенційними технологічними домішками. 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)оцтова кислота входить до структури її відповідної натрієвої солі, отже домішкою вважатися не може. Визначено хроматографічні характеристики, що дозволило достовірно встановити відмінності між АФІ та його домішками. Оптимізовано умови хроматографічного розділення шляхом дослідження впливу складу рухомої фази, зокрема вмісту ацетонітрилу.

2. Встановлено залежність хроматографічного утримування АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок від температури колонки, розраховано термодинамічні параметри процесу, що вказують на екзотермічний характер переносу аналітів з рухомої фази у стаціонарну.

3. Визначено закономірності мас-спектрометричної фрагментації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та супутніх домішок, що стало основою для створення схеми структурної ідентифікації сполук і підтвердження їх чистоти.

4. Валідація розробленої ВЕРХ методики АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату підтвердила її високу точність, селективність, прецизійність, лінійність і чутливість, що засвідчує надійність результатів кількісного визначення досліджуваних речовин. Методика проаналізована з позицій «зеленої» аналітичної хімії із застосуванням інструментів AGREE та GAPI, що дозволило підтвердити її екологічну безпечність і відповідність принципам сталого розвитку у фармацевтичному аналізі.

5. Визначено ізотонічну концентрацію АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату для потенційної лікарської форми парентерального введення, що забезпечує фізіологічну сумісність препарату.

6. Дослідження стабільності АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його 1% розчину за дії стрес-факторів показало, що сполука є термічно, гідролітично та фотостійкою, але чутливою до окиснювальної деградації. Встановлено, що кислотний і лужний гідроліз не мають суттєвого впливу на стабільність, тоді як розчин виявив підвищену фоточутливість. Дослідження стабільності методом «прискореного старіння» дозволило встановити прогнозований термін придатності субстанції та 1% водного розчину, який становить 2 роки за умови зберігання при кімнатній температурі. Для зберігання 1% розчину рекомендовано використовувати тару із бурштинового скла.

7. Проведено фармакокінетичне дослідження АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату на лабораторних щурах, що засвідчило швидке всмоктування сполуки після перорального введення, досягнення максимальної концентрації у плазмі через 15 хвилин і моноекспоненційний характер елімінації. Розраховані фармакокінетичні параметри свідчать про помірну швидкість виведення та потенційно середню тривалість фармакологічної дії. *In silico* прогнозування та експериментальне підтвердження шляхів біотрансформації АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-

ілметил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові показали утворення двох основних метаболітів, а саме О-глюкуроніду та гліцинового кон'югату. Отримані результати доводять метаболічну активність сполуки та підтверджують правильність проведеного прогнозування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kharat, C., Shirsat, V. A., Kodgule, Y. M., & Kodgule, M. (2020). A Validated RP-HPLC Stability Method for the Estimation of Chlorthalidone and Its Process-Related Impurities in an API and Tablet Formulation. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020(1), 3593805. <https://doi.org/10.1155/2020/3593805>
2. Bhalerao, A., Shelke, M. S., & Borkar, V. (2023). Advances, Applications, and Challenges in RP HPLC Method Development. *International Journal of Advanced Research in Science, Communication, and Technology*, 3, 111-23. <https://doi.org/10.48175/IJAR SCT-9017>
3. Varma, M. M., Thulluru, A., Kumar, K. S., Kumar, G. S., & Pavani, K. (2021). HPLC method development and validation: A review. *World J. Pharm. Res.*, 10, 405-426. https://www.researchgate.net/publication/356209578_HPLC_METHOD_DEVELOPMENT_AND_VALIDATION_A_REVIEW
4. Almeida, J., Bezerra, M., Markl, D., Berghaus, A., Borman, P., & Schlindwein, W. (2020). Development and validation of an in-line API quantification method using AQbD principles based on UV-vis spectroscopy to monitor and optimise continuous hot melt extrusion process. *Pharmaceutics*, 12(2), 150. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020150>
5. Hanif, A. M., Bushra, R., Ismail, N. E., Bano, R., Abedin, S., Alam, S., ... & ARIF, M. (2021). Empagliflozin: HPLC based analytical method development and application to pharmaceutical raw material and dosage form. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 34(3), 1081-1087. <https://doi.org/10.36721/PJPS.2021.34.3.SUP.1081-1087.1>
6. Kumar, G. R., Babu, B. S., Rao, R. R., Vardhan, V. M., & Abbaraju, V. K. (2021). Method development and validation of a specific stability indicating RP-HPLC method for molnupiravir API. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(60B), 3026-3035.

7. Sato, Y., Ukei, T., Tsugeno, H., Suga, T., Soeta, T., & Ukaji, Y. (2023). Asymmetric Hetero-Diels–Alder Reaction of 4-Phenyl-1, 2, 4-triazole-3, 5-dione with 2, 4-Dienyl Carboxylic Acids. *Synthesis*, 55(20), 3342–3348. <https://doi.org/10.1055/a-2131-0116>.
8. Karpenko, Y. (2024). Absorption of Free Radicals of New S-Derivatives (1, 2, 4-Triazole-3(2 H)-yl)methylthiopyrimidines. *Chemistry Proceedings*, 16(1), 62. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-28-20181>
9. Dovbnia, D. V., Frolova, Y. S., & Kaplaushenko, A. H. (2023). A study of hypoglycemic activity of acids and salts containing 1, 2, 4-triazole. *Ceska a Slovenska farmacie*, 72(3), 113–124. doi: 10.5817/CSF2023-3-113.
10. Safonov, A. A., & Nevmyvaka, A. V. (2020). Actoprotective activity research of 2-((5-(2-bromophenyl)-4-substituted-4H-1, 2, 4-triazole-3-yl) thio) acetates. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2020.2.207196>
11. Hotsulia, A. S., & Knysh, Y. H. (2020). Synthesis, structure and properties of 7'-((4-amino-5-thio-1, 2, 4-triazole-3-yl) methyl) theophylline derivatives. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2020.2.207019>
12. Karpenko, Y. V., Panasenko, O. I., Kulish, S. M., & Domnich, A. V. (2023). Synthesis and acute toxicity of new S-derivatives (1,2,4-triazole-3(2H)-yl) methyl) thiopyrimidines. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.274586>
13. Bihdan, O. A., Parchenko, V. V., & Gutyj, B. V. (2024). Some transformations in a series of 4-amino-1, 2, 4-triazole-3-thion derivatives. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2024.2.298780>
14. Padash, A., Azarmi, R., Toularoud, A. A. S., Cruz, C., & Esmailpour, B. (2022). A method to mitigating toxicity high concentrations of 1, 2, 4 Triazole (a nitrification inhibitor) in plant with use of the root symbiotic fungi. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2289822/v1>
15. Karpenko, Y. V. (2025). DFT analysis of the [3+2] heterocyclization reaction of ((1,2,4-triazole (1,3,4-oxadiazole)-3(2)-yl)methyl) thiopyrimidines.

16. Ranjani, C. S., Choudhary, K., Akshaya, D., Sachin, T., & Sangeetha, V. (2021). Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of ticagrelor in API form and marketed tablet dosage form. *Int. J. Adv. Res. Med. Pharm. Sci.*, 6(6), 62-70.
17. Al-Shami, N. M., Naseef, H., Moqadi, R., & Kanaze, F. (2024). HPLC Method Development and Validation for the Determination of Apixaban and Clopidogrel in Novel Fixed-Dose Combination Tablets. *Journal of Chemistry*, 2024(1), 2675736. <https://doi.org/10.1155/2024/2675736>
18. Montenegro, M. B., Souza, S. P. D., Leão, R. A., Rocha, H. V., Rezende, C. M. D., & Souza, R. O. D. (2020). Methodology development and validation of amphotericin B stability by HPLC-DAD. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31(5), 916-926. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190256>
19. Zhong, L., Gao, L., Li, L., Nei, L., Wei, Y., Zhang, K., ... & Zang, H. (2022). Method development and validation of a near-infrared spectroscopic method for in-line API quantification during fluidized bed granulation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 274, 121078. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121078>
20. Cruz-Angeles, J., Martínez, L. M., Videa, M., Rodríguez-Rodríguez, J., & Martínez-Jiménez, C. (2021). Development and Validation of a Rapid Analytical Method for the Simultaneous Quantification of Metabolic Syndrome Drugs by HPLC-DAD Chromatography. *Scientia Pharmaceutica*, 89(1), 8. <https://doi.org/10.3390/scipharm89010008>
21. Soujanya, V., & Nalanda, R. B. (2024). Stability-indicating Reverse Phase-HPLC Method Development and Method Validation for Quantitative Determination of Degradation Products in Favipiravir API and Drug Product. *International Journal of TROPICAL DISEASE & Health*, 45(7), 10-25. <https://doi.org/10.9734/ijtdh/2024/v45i71557>
22. Vejendla, A., Talari, S., Moturu, R., Boddapati, S. M., & Kola, A. E. (2021). Method development and validation for Cabotegravir and Rilpivirine by using HPLC and its degradants are characterized by LCMS and FTIR. *Future*

Journal of Pharmaceutical Sciences, 7(1), 226. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00355-8>

23. Abualhasan, M., Shraim, F., Alawni, H., Hamdan, S., & Khaseeb, H. (2022). HPLC analytical method development and validation of gabapentin through chemical derivatization with catechol as a chromophore. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2022(1), 3882682. <https://doi.org/10.1155/2022/3882682>
24. Yasin, D. S., Bingül, A. A., Karaküçük, A. L. P. T. U. Ğ., & Teksin, Z. Ş. (2021). Development and validation of an HPLC method using an experimental design for analysis of amlodipine besylate and enalapril maleate in a fixed-dose combination. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 18(3), 306. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2020.89725>
25. Sammut Bartolo, N., Vella Szijj, J., Ferrito, V., & Serracino-Inglott, A. (2023). HPLC-UV method development and validation to monitor difluprednate synthesis. *Journal of Chromatographic Science*, 61(4), 322-328. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmac108>
26. Iqbal, D. N., Ashraf, A., Iqbal, M., & Nazir, A. (2020). Analytical method development and validation of hydrocortisone and clotrimazole in topical dosage form using RP-HPLC. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00065-7>
27. Manoranjani, M. (2021). A study of method development, validation and forced degradation for simultaneous quantification of cisplatin and fluorouracil in bulk and pharmaceutical dosage form by RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 13(3), 155-161.
28. Yabré, M., Ferey, L., Somé, T. I., Sivadier, G., & Gaudin, K. (2020). Development of a green HPLC method for the analysis of artesunate and amodiaquine impurities using Quality by Design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 190, 113507. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113507>
29. Lakka, N. S., Kuppan, C., & Ravinathan, P. (2021). Impurity profiling and stability-indicating method development and validation for the estimation of assay and degradation impurities of midostaurin in softgel capsules using HPLC and

LC–MS. *Biomedical Chromatography*, 35(12), e5222.
<https://doi.org/10.1002/bmc.5222>

30. Reddy, K. T. K., & Haque, M. A. (2022). Bioanalytical method development and validation of atrasentan in human plasma using verapamil as internal standard by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *International Journal of Health Sciences*, 6(S8), 625-638.
<https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS8.10470>

31. Fares, M. Y., Hegazy, M. A., El-Sayed, G. M., Abdelrahman, M. M., & Abdelwahab, N. S. (2022). Quality by design approach for green HPLC method development for simultaneous analysis of two thalassemia drugs in biological fluid with pharmacokinetic study. *RSC advances*, 12(22), 13896-13916.
<https://doi.org/10.1039/D2RA00966H>

32. Fine, J., Mann, A. K. P., & Aggarwal, P. (2024). Structure Based Machine Learning Prediction of Retention Times for LC Method Development of Pharmaceuticals. *Pharmaceutical Research*, 41(2), 365-374.
<https://doi.org/10.1007/s11095-023-03646-2>

33. Raju, M. D. (2021). Development and validation of HPLC method for the determination of lasmiditan drug in bulk and tablet dosage form. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 13(3), 170-173.

34. Urich, J. A. A., Marko, V., Boehm, K., Karrer, J., Koeberle, M., & Salar-Behzadi, S. (2023). Development and Validation of a Stability Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Metformin, Hydrochlorothiazide and Acetylsalicylic Acid in an On-Demand Fixed-Dose Combination Dosage Form. *Journal of Analytical Chemistry*, 78(12), 1760-1769.
<https://doi.org/10.1134/S1061934823120195>

35. Mathur, A., & Vejendla, R. (2023). Novel Method Development, Validation and Stability Indicating Assay Method for Rivastigmine Tartarate Capsule by HPLC. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 13(2), 79-88.
<https://doi.org/10.52711/2231-5675.2023.00014>

36. Żuromska-Witek, B., Stolarczyk, M., Szłósarczyk, M., Kielar, S., & Hubicka, U. (2022). Simple, accurate and multianalyte determination of thirteen active pharmaceutical ingredients in Polypills by HPLC-DAD. *Chemosensors*, 11(1), 25. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11010025>
37. Nekkalapudi, A. R., Navuluri, S., Pippalla, S., Katari, N. K., Cholleti, V. K., & Bapatu, H. R. (2024). Development of HPLC method for ixabepilone (oncology drug) in bulk and dosage form: Quantification of impurities and forced degradation studies. *Journal of Chromatographic Science*, 62(3), 222-231. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmad049>
38. Brighenti, V., Marani, M., Caroli, C., Bertarini, L., Gaggiotti, A., Pollastro, F., ... & Pellati, F. (2024). A new HPLC method with multiple detection systems for impurity analysis and discrimination of natural versus synthetic cannabidiol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416(20), 4555-4569. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05396-5>
39. Gaikwad, A. V., & Khulbe, P. (2022). HPLC method development for the estimation of empagliflozin in bulk and pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 34(23B), 22-31. <https://doi.org/10.9734/JPRI/2022/v34i23B35926>
40. PANDIT, R. K., & PANDEY, V. (2025). DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GRADIENT PROGRAM RP-HPLC METHOD FOR ESTIMATION OF MULTIPLE ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS IN AN ORAL SUSPENSION TASTE MASKED WITH AN ION EXCHANGE RESIN. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 17(4), 370-386. <https://doi.org/10.22159/ijap.2025v17i4.53547>
41. Riaz, N., Iftikhar, M., Saleem, M., Hussain, S., Rehmat, F., Afzal, Z., ... & al-Rashida, M. (2020). New synthetic 1, 2, 4-triazole derivatives: Cholinesterase inhibition and molecular docking studies. *Results in Chemistry*, 2, 100041. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2020.100041>

42. Amin, N. H., El-Saadi, M. T., Ibrahim, A. A., & Abdel-Rahman, H. M. (2021). Design, synthesis and mechanistic study of new 1, 2, 4-triazole derivatives as antimicrobial agents. *Bioorganic chemistry*, 111, 104841. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104841>
43. Sathyanarayana, R., & Poojary, B. (2020). Exploring recent developments on 1, 2, 4-triazole: Synthesis and biological applications. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 67(4), 459-477. <https://doi.org/10.1002/jccs.201900304>
44. Liao, L., Jiang, C., Chen, J., Shi, J., Li, X., Wang, Y., ... & Zhang, J. (2020). Synthesis and biological evaluation of 1, 2, 4-triazole derivatives as potential neuroprotectant against ischemic brain injury. *European journal of medicinal chemistry*, 190, 112114. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112114>
45. Gotsulya, A., & Brytanova, T. (2022). Synthesis, properties and biological potential some condensed derivatives 1, 2, 4-triazole. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 46(2), 308-321. <https://doi.org/10.33483/jfpau.971602>
46. Sameliuk, Y., Kaplaushenko, T., & Al Zedan, F. (2021). 1, 2, 4-triazole derivatives in medicine and pharmacy and application prospects. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 45(3), 598-614. <https://doi.org/10.33483/jfpau.885888>
47. Kumari, M., Tahlan, S., Narasimhan, B., Ramasamy, K., Lim, S. M., Shah, S. A. A., ... & Kakkar, S. (2021). Synthesis and biological evaluation of heterocyclic 1, 2, 4-triazole scaffolds as promising pharmacological agents. *BMC chemistry*, 15(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13065-020-00717-y>
48. Sangamithra, R., Meyyanathan, S. N., & Babu, B. (2023). A novel chiral HPLC and LC-MS/MS method development for the triazole antifungal compound. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 13(1), 001-008. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2023.118532>
49. Parchenko, V. V., Panasenko, O. I., Karpenko, Y. V., Kyrychko, B. P., Zvenihorodska, T. V., Bigdan, O. A., ... & Martynyshyn, V. P. (2024). Content of 1,

2, 4-triazole derivatives in cow's milk, meat samples and animal organs after administration. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 15(4), 830-836. <https://doi.org/10.15421/0224119>

50. Nandagopal, A., & Raju, N. A. (2025). Novel RP-HPLC method for quantification of peramivir and its impurity (1 H-1, 2, 4-triazole-1-carboximidamide) in bulk and injectable preparations. *Discover Chemistry*, 2(1), 132. <https://doi.org/10.1007/s44371-025-00211-1>

51. Varynskyi, B. O., & Kaplaushenko, A. G. (2020). ESI-MS fragmentation pathways of some 1,2,4-triazole-3-thiones, the intermediate compounds in the synthesis of active pharmaceutical ingredients. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*, 18(1 (69)), 22-33. <https://doi.org/10.24959/ophcj.20.177613>

52. Varynskyi, B. O., & Kaplaushenko, A. H. (2020). Metabolism study of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio) acetate. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 33(2), 72-75. <https://doi.org/10.2478/cipms-2020-0014>

53. Bollmann, U.E. & Badawi, N (2020). A fast and simple SPE-LC-MS/MS procedure for extraction and quantitative analysis of 1,2,4-triazole, *N,N*-dimethylsulfamide, and other small polar organic compounds in groundwater. *Anal Bioanal Chem*, 412, 5683-5693. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02788-1>

54. Zhu, X. P., Lin, G. S., Duan, W. G., Li, Q. M., Li, F. Y., & Lu, S. Z. (2020). Synthesis and antiproliferative evaluation of novel longifolene-derived tetralone derivatives bearing 1, 2, 4-triazole moiety. *Molecules*, 25(4), 986. <https://doi.org/10.3390/molecules25040986>

55. Shcherbyna, R., Kalchenko, V., Kulish, S., Salionov, V., Morozova, L., Nedorezaniuk, N., Mazur, O. (2023). Synthesis, characterization, molecular docking studies of new alkyl derivatives of 5-(2-bromo-4-fluorophenyl)-4-ethyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol. *Ceska a Slovenska Farmacie*, 72 (4), 190-200. Available at: <https://csfarmacie.cz/pdfs/csf/2023/04/05.pdf>

56. Safonov, A. (2020). Method of synthesis novel N'-substituted2-((5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetohydrazides. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(2), 242-252. <https://doi.org/10.33483/jfpau.580011>
57. Zvenihorodska, T., Hotsulia, A., Kravchenko, S., Fedotov, S., & Kyrychko, B. (2021). Synthesis and antimicrobial action of 1, 2, 4-triazole derivatives containing theophylline and 1, 3, 4-thiadiazole fragments in their structure. *African Journal of Biomedical Research*, 24 (1), 159-163. EID: 2-s2.0-85111463390
58. Paprocka, R., Kołodziej, P., Wiese-Szadkowska, M., Helmin-Basa, A., & Bogucka-Kocka, A. (2022). Evaluation of anthelmintic and anti-inflammatory activity of 1, 2, 4-triazole derivatives. *Molecules*, 27(14), 4488. <https://doi.org/10.3390/molecules27144488>
59. Pham, D. T., Nguyen, V. T., Vu, B. D., & Phan, D. C. (2022). A New Method for the Synthesis of N, N-Diethyl-m-Methylbenzamide from m-Toluic Acid and Diethylamine Using 1, 1'-Carbonyl-di-(1,2,4-triazole)(CDT) as Coupling Agent. *Letters in Organic Chemistry*, 19(9), 766-769. <https://doi.org/10.2174/1570178618666211119121227>
60. Černá, K., & Kozlík, P. (2024). Chromatographic method for rapid determination of triazoles in ribavirin intermediates synthesis: stationary phase comparison. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 155(8), 805-811. <https://doi.org/10.1007/s00706-024-03232-1>
61. Ana, G., Malebari, A. M., Noorani, S., Fayne, D., O'Boyle, N. M., Zisterer, D. M., ... & Meegan, M. J. (2025). (E)-1-(3-(3-Hydroxy-4-Methoxyphenyl)-1-(3, 4, 5-Trimethoxyphenyl) allyl)-1H-1,2,4-Triazole and Related Compounds: Their Synthesis and Biological Evaluation as Novel Antimitotic Agents Targeting Breast Cancer. *Pharmaceuticals*, 18(1), 118. <https://doi.org/10.3390/ph18010118>
62. Giuso, V., Thierry, T., Gourlaouen, C., Mercandelli, P., Vanthuyne, N., Mauro, M., & Bellemin-Laponnaz, S. (2025). A chiral Si (iv) complex bearing a 1,

2, 4-triazole-2,2'-diphenol ligand: synthesis,(chiro-) optical properties and computational investigation. *Dalton Transactions*, 54(16), 6684-6693. <https://doi.org/10.1039/D5DT00392J>

63. Mustafa, M., Abuo-Rahma, G. E. D. A., Abd El-Hafeez, A. A., Ahmed, E. R., Abdelhamid, D., Ghosh, P., & Hayallah, A. M. (2021). Discovery of antiproliferative and anti-FAK inhibitory activity of 1, 2, 4-triazole derivatives containing acetamido carboxylic acid skeleton. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 40, 127965. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127965>

64. Li, B., Duan, W., Lin, G., Cui, Y., Wen, R., Liu, C., & Xie, Y. (2023). Rational design and synthesis of L-carvone-derived 4-methyl-1, 2, 4-triazole-thioether/nanochitosan complexes as potent nanopesticides for sustainable and efficient herbicidal application. *Environmental Science: Nano*, 10(12), 3317-3328. <https://doi.org/10.1039/D3EN00573A>

65. Apan, A., Casoni, D., Leonte, D., Pop, C., Iaru, I., Mogoşan, C., & Zaharia, V. (2024). Heterocycles 52: The drug-likeness analysis of anti-inflammatory thiazolo [3, 2-b][1, 2, 4] triazole and imidazo [2, 1-b][1, 3, 4] thiadiazole derivatives. *Pharmaceuticals*, 17(3), 295. <https://doi.org/10.3390/ph17030295>

66. Alsulaimany, M., Binjubair, F. A., Tatar, E., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Warrilow, A. G., ... & Simons, C. (2025). Exploring medium and long arm extensions of 1, 2, 4-triazole derivatives as *Candida albicans* 14 α -demethylase (CYP51) inhibitors. *RSC medicinal chemistry*, 16(5), 2270-2280. <https://doi.org/10.1039/D4MD00863D>

67. Fedotov, S. O., & Hotsulia, A. S. (2023). Synthesis and properties of S-alkyl 4-amino-5-(5-(3-fluorophenyl)-pyrazol-3-yl)-1, 2, 4-triazole-3-thiol derivatives. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*, 16 (1), 5-11. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.1.273461>

68. Thorsteinsdóttir, U. A., & Thorsteinsdóttir, M. (2021). Design of experiments for development and optimization of a liquid chromatography coupled

to tandem mass spectrometry bioanalytical assay. *Journal of Mass Spectrometry*, 56(9), e4727. <https://doi.org/10.1002/jms.4727>

69. Bell, D. (2023). New Liquid Chromatography Columns and Accessories: What to Know for 2023.

70. Guimaraes GJ, Saad JG, Annavarapu V, Bartlett MG. (2023). Mobile Phase Aging and Its Impact on Electrospray Ionization of Oligonucleotides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 6, 34(12), 2691-2699. <https://doi.org/10.1021/jasms.3c00264>

71. Turković, L., Mutavdžić Pavlović, D., Mlinarić, Z., Skenderović, A., Silovski, T., & Sertić, M. (2023). Optimisation of solid-phase extraction and LC-MS/MS analysis of six breast cancer drugs in patient plasma samples. *Pharmaceuticals*, 16(10), 1445. <https://doi.org/10.3390/ph16101445>

72. Bheemanapally, K., Ibrahim, M. M., & Briski, K. P. (2021). HPLC–electrospray ionization–mass spectrometry optimization by high-performance design of experiments for astrocyte glutamine measurement. *Journal of Mass Spectrometry*, 56(2), e4680. <https://doi.org/10.1002/jms.4680>

73. Patel, D., Vora, A., Wairkar, S., & Yc, M. (2021). Design of experiment-based LC-MS/MS method development for simultaneous estimation of nateglinide and metformin hydrochloride in rat plasma. *Journal of Mass Spectrometry*, 56(11), e4789. <https://doi.org/10.1002/jms.4789>

74. Arvapally, M., Asati, A., Nagendla, N. K., & Mudiam, M. K. R. (2021). Development of an analytical method for the quantitative determination of multi-class nutrients in different food matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry using design of experiments. *Food Chemistry*, 341, 128173. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128173>

75. Suárez-González, J., Cáceres-Pérez, A. R., Oliva, A., Santoveña-Estévez, A., & Fariña, J. B. (2022). Development and Optimization of a New UPLC-UV/MS Method through DoE and MLR for Detecting Substandard Drug Products to Treat Tuberculosis. *Molecules*, 27(20), 7141. <https://doi.org/10.3390/molecules27207141>

76. Rocha AL, Lourenço FR. (2023) Development and optimization of a LC-MS/MS compatible method for quantification of losartan, hydrochlorothiazide and their impurities using AQbD approach and measurement uncertainty evaluation. *Talanta*, 259, 124481. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124481>
77. Havrylenko, O., Kondratova, Y., Ivanets, L., Berdey, I., & Logoyda, L. (2025). Optimization of HPLC methods for the development of quality control methods of combined powder formulations with paracetamol, phenylephrine hydrochloride, pheniramine maleate. *BMC chemistry*, 19(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13065-025-01488-0>
78. Shcherbyna, R. (2020). An investigation of the pharmacokinetics and potential metabolites of potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4H-1, 2, 4-triazol-3-yl) thio) acetate on rats. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(2), 233-241. <https://doi.org/10.33483/jfpau.681611>
79. Gunawan, U., Ibrahim, S., Ivansyah, A. L., & Damayanti, S. (2023). Separation and analysis of triazole antifungal in biological matrices by liquid chromatography: a review. *Pharmacia*, 70, 1265-1281. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.70.e111511>
80. Elbarbry, F. A., Hecker, B., Espiritu, M. J., Elsawi, A. E., & Eldehna, W. M. (2025). LC–MS/MS Assay for Simultaneous Quantification of Dual-Targeting 1, 5-Diaryl-1, 2, 4-Triazole Sulfonamides (WA11-13) in Human Plasma. *Biomedical Chromatography*, 39(8), e70165. <https://doi.org/10.1002/bmc.70165>
81. Liang, H., Guo, R., Zhou, Y., Lv, C., Guo, C., Su, F., ... & Xu, W. (2025). Pharmacokinetics and Tissue Distribution Study for 2-(2-Fluorophenyl)-5-Phenyl-7-Alkoxy-[1,2,4]Triazole[1,5-a]Pyrimidine Antiepileptic Compounds in Rats. *Biomedical Chromatography*, 39(5), e70088. <https://doi.org/10.1002/bmc.70088>
82. Makuch-Kocka, A., Andres-Mach, M., Zagaja, M., Śmiech, A., Pizoń, M., Flieger, J., ... & Plech, T. (2021). Effect of Chronic Administration of 5-(3-chlorophenyl)-4-Hexyl-2, 4-Dihydro-3 H-1, 2, 4-Triazole-3-Thione (TP-315)—A

New Anticonvulsant Drug Candidate - On Living Organisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3358. <https://doi.org/10.3390/ijms22073358>

83. Witkowska, A. B., Wołczyńska, A., Lis-Cieplak, A., & Stolarczyk, E. U. (2023). Development and validation of LC-MS/MS method for the determination of 1-methyl-4-nitrosopiperazine (MNP) in multicomponent products with rifampicin-analytical challenges and degradation studies. *Molecules*, 28(21), 7405. <https://doi.org/10.3390/molecules28217405>

84. Campbell, J. M., Colombo, S., Doyle, J. L., Filoti, D. I., Hübner, G., Magnenat, L., ... & Stokes, E. S. (2024). An industry perspective on the use of forced degradation studies to assess comparability of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 113(3), 505-512. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.12.011>

85. Gogikar, S. K., Sen, S., Pathinti, S., Samanthula, G., & Dikundwar, A. G. (2025). Forced Degradation Study of an Anti-Diabetic Drug Imeglimin: Impurity Profiling and Structure Elucidation Using LC-Q-ToF-MS/MS and NMR. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 39(5), e9960. <https://doi.org/10.1002/rcm.9960>

86. Rochani, A. K., Wheatley, M., Oeffinger, B. E., Eisenbrey, J. R., & Kaushal, G. (2020). LC-MS based stability-indicating method for studying the degradation of lonidamine under physical and chemical stress conditions. *Research in pharmaceutical sciences*, 15(4), 312-322. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.293509>

87. Reddy, G. M. K., Singamsetti, J. M., Kaliyaperumal, M., Doddipalla, R., Ivaturi, R., Rumalla, C. S., ... & Babu, B. K. (2020). Degradation studies of levosimendan isolation, identification, and structure confirmation of stress degradation products using LCMS, mass mediated Prep-HPLC, NMR, HRMS, SFC and FTIR. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 43(1-2), 17-28. <https://doi.org/10.1080/10826076.2019.1613429>

88. Wróblewski, K., Szultka-Młyńska, M., Janiszewska, D., Petruczynik, A., & Buszewski, B. (2022). Development of the Validated Stability-Indicating

Method for the Determination of Vortioxetine in Bulk and Pharmaceutical Formulation by HPLC-DAD, Stress Degradation Kinetics Studies and Detection of Degradation Products by LC-ESI-QTOF-MS. *Molecules*, 27(6), 1883. <https://doi.org/10.3390/molecules27061883>

89. Modhave, D., Vrielynck, S., & Roeleveld, K. (2024). Assessing drug product shelf life using the accelerated stability assessment program: A case study of a GLPG4399 capsule formulation. *Pharmaceutics*, 16(11), 1400. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16111400>

90. Sharma, R. (2025). Stability Studies and Shelf-Life Determination of Pharmaceutical Formulations. *Journal of Pharmaceutical Chemistry and Drug formulation*, 7(2).

91. Dong, M., & Huynh-Ba, K. (2020). Stability studies and testing of pharmaceuticals-an overview. *LCGC Europe*, 33(6). <https://www.chromatographyonline.com/view/stability-studies-and-testing-pharmaceuticals-overview-0>

92. Shahnawaz, S. A. S., & Shaikh, A. (2025). Stability Indicating HPLC Method Development: A. *Research Journal of Pharmacy and Medical Sciences (IRJPMS)*, 8(3), 26-33.

93. González-González, O., Ballesteros, M. P., Torrado, J. J., & Serrano, D. R. (2023). Application of accelerated predictive stability studies in extemporaneously compounded formulations of chlorhexidine to assess the shelf life. *Molecules*, 28(23), 7925. <https://doi.org/10.3390/molecules28237925>

94. Bhujbal, S., Rupenthal, I. D., & Agarwal, P. (2024). Development and validation of a stability-indicating HPLC method for assay of tonabersat in pharmaceutical formulations. *Methods*, 231, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2024.10.001>

95. Mishra, S., Chauhan, A., & Ramajayam, R. (2024). Isolation, identification and structural characterization of forced degradation products of mobocertinib using LC-MS/MS and NMR. *Results in Chemistry*, 7, 101465. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2024.101465>

96. Campbell, J. M., Colombo, S., Doyle, J. L., Filoti, D. I., Hübner, G., Magnenat, L., ... & Stokes, E. S. (2024). An industry perspective on the use of forced degradation studies to assess comparability of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 113(3), 505-512. doi: 10.1016/j.xphs.2023.12.011.
97. Ghimire, P., Shrestha, A. C., & Pandey, S. (2020). Guidelines on stability studies of pharmaceutical products and shelf life estimation. *Int J Adv Pharm Biotechnol*, 6(1), 15-23. <https://doi.org/10.38111/ijapb.20200601004>
98. Agarwal, P., Craig, J. P., & Rupenthal, I. D. (2021). Formulation considerations for the management of dry eye disease. *Pharmaceutics*, 13(2), 207. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020207>
99. Vicario-de-la-Torre, M., Puebla-García, V., Ybañez-García, L., López-Cano, J. J., González-Cela-Casamayor, M. A., Brugnera, M., ... & Herrero-Vanrell, R. (2024). Topical insulin eye drops: Stability and safety of two compounded formulations for treating persistent corneal epithelial defects. *Pharmaceutics*, 16(5), 580. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16050580>
100. López-Cano, J. J., González-Cela-Casamayor, M. A., Andrés-Guerrero, V., Vicario-de-la-Torre, M., Del Castillo, J. B., Herrero-Vanrell, R., & Molina-Martínez, I. T. (2022). Development of an osmoprotective microemulsion as a therapeutic platform for ocular surface protection. *International journal of pharmaceutics*, 623, 121948. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121948>
101. Sadowska, A., Świdorski, F., & Laskowski, W. (2020). Osmolality of components and their Application in the design of functional recovery drinks. *Applied Sciences*, 10(21), 7663. <https://doi.org/10.3390/app10217663>
102. Strickley, R. G., & Lambert, W. J. (2021). A review of formulations of commercially available antibodies. *Journal of pharmaceutical sciences*, 110(7), 2590-2608. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.03.017>
103. Державна Фармакопея України (2001). Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків. : PIPEГ, 2001.
104. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) (2023). 11th Edition. Strasbourg, Council of Europe.

105. United States Pharmacopeia (USP). (2020). Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention.
106. Mazet, R., Yaméogo, J. B., Wouessidjewe, D., Choisnard, L., & Gèze, A. (2020). Recent advances in the design of topical ophthalmic delivery systems in the treatment of ocular surface inflammation and their biopharmaceutical evaluation. *Pharmaceutics*, 12(6), 570. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060570>
107. Silva, M. H., Hudson, S., Tajber, L., Garin, M., Dong, W., Khamiakova, T., & Holm, R. (2022). Osmolality of excipients for parenteral formulation measured by freezing point depression and vapor pressure-a comparative analysis. *Pharmaceutical Research*, 40, 1709-1722. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03262-6>
108. Madden, M. J., Ellis, S. N., Riabtseva, A., Wilson, A. D., Cunningham, M. F., & Jessop, P. G. (2022). Comparison of vapour pressure osmometry, freezing point osmometry and direct membrane osmometry for determining the osmotic pressure of concentrated solutions. *Desalination*, 539, 115946. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2022.115946>
109. Umar, A. K., Wathoni, N., Hasanah, A. N., Kurniawansyah, I. S., & Abdassah, M. (2019). Kahar method: a novel calculation method of tonicity adjustment. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 11(Suppl 4), S635-S649. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_210_19
110. Сафонов, А. А. (2023). Синтез, перетворення, фізико-хімічні і біологічні властивості похідних 1, 2, 4-триазолу, які містять тіофен-2-ілметильний замісник (Дисертація д-ра фарм. наук). Запорізький державний медичний університет. Запоріжжя. <http://dspace.zsmu.edu.ua/handle/123456789/20554>
111. Державна Фармакопея України (2008). Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 2. Харків.
112. URL: <https://biotransformer.ca>
113. URL: <https://mzio.io/mzmine-news>
114. URL: <https://www.metaboanalyst.ca/faces/ModuleView.xhtml>

115. Державна Фармакопея України (2004). Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 1. Харків : РІРЕГ.
116. Державна Фармакопея України (2008). Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. (доп. 2, с. 620). Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».
117. Державна Фармакопея України (2009). Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. (доп. 3, с. 280). Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».
118. Державна Фармакопея України (2011). Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. (доп. 4, с. 540). Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».
119. Державна Фармакопея України (2015). Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид. (т. 1, с. 1128). Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».
120. Державна Фармакопея України (2014). Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид. (т. 2, с. 724). Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. 724 с.
121. Державна Фармакопея України (2014). Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид. (т. 3, с. 732). Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».
122. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, & Center for Veterinary Medicine. (2018). *Bioanalytical method validation: Guidance for industry*. U.S. Department of Health and Human Services.
123. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. (2011). *Guideline on bioanalytical method validation*. European Medicines Agency.
124. Міністерство охорони здоров'я України, Державне підприємство «Державний експертний центр». (2013). *Валідація біоаналітичного методу: Методичні рекомендації*. Київ.

125. Сафонов, А. А., Панасенко, О. І., Книш, Є. Г., & Самура, Т. О. (2015). Синтез і фізико-хімічні властивості 2-((4-(R-аміно)-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1, 2, 4-тріазол-3-іл)тіо) ацетатних кислот. *Одеський медичний журнал*, (4), 13-16. https://files.odmu.edu.ua/journal/OMJ_2015.04/m154_13.pdf
126. Kanchi, S., Singh, P., & Bisetty, K. (2014). Dithiocarbamates as hazardous remediation agent: A critical review on progress in environmental chemistry for inorganic species studies of 20th century. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(1), 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.026>
127. Schoenmakers, P. J. (1986). *Optimization of chromatographic selectivity: a guide to method development* (Vol. 35). Amsterdam, Netherlands. Elsevier.
128. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 6th Edition. Strasbourg, Council of Europe. 2008.
129. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. (1994). *Reviewer guidance: Validation of chromatographic methods*. U.S. Department of Health and Human Services.
130. Usenko, D. L., Varynskyi, B. O., & Kaplaushenko, A. H. (2023). Thermodynamic Functions of Chromatographic Retention of Sodium 2-((4-Amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate and its Impurities. *PHARMAKEFTIKI*. 35(2), 32-41. <https://pharmakeftiki.hsmc.gr/pj/issue/view/24/24>
131. Linford, M. R., Jensen, D. S., Teutenberg, T., & Clark, J. (2012). Elevated temperatures in liquid chromatography, Part II: Basic thermodynamics of elevated temperature LC, including the van 't Hoff relationship. *LCGC North America*. 30(11), 992-998.
132. Гризодуб, А. И., Леонтьев, Д. А., Денисенко, Н. В., & Подпружников, Ю. В. (2004). Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта. *Фармаком*, (3), 3-17.

133. European Medicines Agency. (2011). *Committee for medicinal products for human use: guideline on bioanalytical method validation*. London: European Medicines Agency.

134. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Термодинамічні характеристики обернено-фазового хроматографічного утримання натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали X наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої пам'яті зав. каф. управління та економіки фармації з технологією ліків, д-ра фарм. наук, проф. Т.А. Грошового*. (с. 195). ТНМУ, Тернопіль, Україна. 195.

135. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Розробка методики детектування комплексу супутніх домішок натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою ВЕРХ-МС. *Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації (Topical issues of clinical pharmacology and clinical pharmacy): матеріали наук.-практ. internet-конф. з міжнар. участю*. (с. 271). НФаУ, Харків, Україна.

136. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Валідація методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою ВЕРХ-МС. *Матеріали XII Науково-практичної конференції з міжнародною участю Школи молодих науковців АТ «Фармак» «НАУКА, ІННОВАЦІЇ ТА ЯКІСТЬ В СУЧАСНОМУ ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ»*. (с. 100-101). АТ «Фармак», Київ, Україна.

137. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Розробка та оптимізація умов ВЕРХ-МС детектування натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в комплексі з супутніми домішками. *Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2024»*. (с. 119-120). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна. 119-120.

138. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2025). Вивчення закономірностей мас-спектрометричного розпаду АФІ натрій 2-((4-аміно-5-

(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його супутніх домішок. *VII науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації».* (с. 304-305). НФаУ, Харків, Україна.

139. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2025). Оцінка впливу на навколишнє середовище ВЕРХ методики кількісного визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія: збірник тез II Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 95-річчю Київського національного університету технологій та дизайну.* (с. 125). КНУТД, Київ, Україна.

140. Усенко, Д. Л., Сафонов, А. А., Варинський, Б. О., Каплаушенко, А. Г. (2023). Спосіб кількісного визначення натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (Патент на винахід № 127442). *Укрпатент*. URL: <https://base.nipo.gov.ua/searchbulletin/search.php?action=viewdetails&dbname=invc&IdClaim=286029>

141. Blessy, M. R. D. P., Patel, R. D., Prajapati, P. N., & Agrawal, Y. K. (2014). Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 4(3), 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>

142. Verma, A., Singla, S., & Palia, P. (2022). The development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-a review. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 10(2), 83-89. <http://dx.doi.org/10.22270/ajprd.v10i2.1104>

143. European Parliament & Council of the European Union. (2010). *Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes*. Official Journal of the European Union, L 276, 33-79.

144. Safonov, A., Demianenko, D., Vashchyk, Y., Lytkin, D., Polonets, O., Kosareva, A., & Morozova, L. (2024). Study of the stress-protective effect of sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate. *HUJPHARM*, 44(2), 143-152. <https://doi.org/10.52794/hujpharm.1374871>
145. Reynolds, P. S. (2024). A guide to sample size for animal-based studies. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
146. Mann Whitney U test calculator. (2017). Statistics Kingdom. Retrieved October 25, 2019, http://www.statskingdom.com/170median_mann_whitney.html
147. Wei, Z., Liu, X., Cheng, C., Yu, W., & Yi, P. (2021). Metabolism of amino acids in cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 603837. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.603837>
148. Kono, M., Yoshida, N., & Tsokos, G. C. (2021). Amino acid metabolism in lupus. *Frontiers in Immunology*, 12, 623844. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.623844>
149. Усенко, Д. Л., Каплаушенко, А. Г., & Варинський, Б. О. (2024). Визначення ізотонічності 1% розчину натрію 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*, 17, 1(44), 31-34. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2024.1.292556>
150. Usenko, D. L., & Kaplaushenko, A. G. (2024). Study of stress degradation and determination of the stability of the substance and injection solution of sodium 2-((4-amino-5-thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate. *Одеський медичний журнал*, 2(187), 85-89. <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2024-2-15>
151. Usenko, D. L., Varynskyi, B. O., Kaplaushenko, A. G., Safonov, A. A., Panasenko, O. I., Morozova, L. P., ... & Solomennyyi, A. M. (2024). The research of pharmacokinetic parameters and metabolism of sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate for use in military and civilian medicine. *Український журнал військової медицини*, 5(4), 159-167. [https://doi.org/10.46847/ujmm.2024.4\(5\)-159](https://doi.org/10.46847/ujmm.2024.4(5)-159)

152. Усенко, Д. Л., Сафонов, А. А., Варинський, Б. О., Каплаушенко, А. Г. (2022). Дослідження прискореної деградації натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали ІХ наук.-практ. конф. з міжнар.участю.* (с. 92-93). ТНМУ, Тернопіль, Україна.

153. Усенко, Д. Л., Варинський Б. О., Каплаушенко А. Г. (2023). Визначення стабільності ін'єкційного розчину натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в ампулах методом "прискореного старіння". *Безперервний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи: матер. наук.-практ. конференції з міжнар. участю, присвяченої 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету.* (с. 235). НФаУ, Харків, Україна.

154. Усенко, Д. Л., Варинський Б. О., Каплаушенко А. Г. (2023). Вивчення фармакокінетичних параметрів натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в сироватці крові щурів. *Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2023».* (с. 134). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна.

155. Усенко, Д. Л. (2024). Прогнозування, ідентифікація та хеометричний пошук метаболітів натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Тези доповідей 93 науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації».* (с. 22). ІФНМУ, Івано-Франківськ, Україна.

156. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2025). Аналітичний супровід АФІ та лікарської форми на основі натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою ВЕРХ та ВЕРХ-МС. *Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю*

«Запорізький фармацевтичний форум - 2025». (с. 140-141). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна.

ДОДАТОК А
АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ
ДОДАТОК А1

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з науково-практичної
роботи Національного університету
біоресурсів і природокористування
України, д.с-г.н., проф.

Оксана ТОНХА

“ 18 ”  20 14 р.

Акт впровадження

1. Найменування для впровадження: Спосіб кількісного визначення натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату.

2. Ким запропоновано: Запорізьким державним медико-фармацевтичним університетом, кафедрою фізикоїдної хімії.

3. Автори: Дмитро УСЕНКО, Андрій САФОНОВ, Борис ВАРИНСЬКИЙ, Андрій КАПЛАУШЕНКО.

4. Джерело інформації: Патент на винахід 127442 Україна, МПК G01N 30/00 (2023.01). Спосіб кількісного визначення натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату / Усенко Д.Л., Сафонов А.А., Варинський Б.О., Каплаушенко А.Г. № а 2021 04603; заявк. 09.08.2021; публ. 23.08.2023, бюл. №32.

5. Ким і коли впроваджено: в науковий і навчальний процес кафедри загальної, органічної та фізичної хімії НУБІП 2024 рік. Протокол № 8 від 13.03.2024 р.

6. Зауваження та пропозиції: продовжити роботу по аналізу та дослідженню натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату і в тому числі похідних 1,2,4-тріазол-3-тіонів.

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри загальної,
органічної та фізичної хімії,
д. хім. н., професор



Андрій ГАЛСТЯН

ДОДАТОК А2

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

В.о. проректора з наукової роботи
Івано-Франківського національного
медичного університету



д. мед. н., проф. Ірина ДМИТРИШИН
20 24 р.

Акт впровадження

- 1. Найменування для впровадження:** Визначення ізотонічності 1 % розчину натрію 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.
- 2. Ким запропоновано:** Запорізьким державним медико-фармацевтичним університетом, кафедрою фізколоїдної хімії.
- 3. Автори:** Дмитро УСЕНКО, Андрій КАПЛАУШЕНКО, Борис ВАРИНСЬКИЙ.
- 4. Джерело інформації:** Визначення ізотонічності 1 % розчину натрію 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2024. Т. 17. №1(44). С. 31-34.
- 5. Ким і коли впроваджено:** в науковий і учбовий процес кафедрою фармацевтичного управління, технології ліків та фармакогнозії Івано-Франківського національного медичного університету. Протокол № 9 від 28.02.2024 р.
- 6. Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу по аналізу та дослідженню натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату і в тому числі похідних 1,2,4-тріазол-3-тіонів.

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри
фармацевтичного управління,
технології ліків та фармакогнозії

д. фарм. н., проф. Андрій ГРИЦИК

ДОДАТОК АЗ

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету ім. І. Я.
Горбачевського, д.біол.н., проф.
Іван КЛІЩ

20 24 р.

Акт впровадження

1. Найменування для впровадження: Thermodynamic Functions of Chromatographic Retention of Sodium 2-((4-Amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio) acetate and its Impurities.

2. Ким запропоновано: Запорізьким державним медико-фармацевтичним університетом, кафедрою фізколоїдної хімії.

3. Автори: Дмитро УСЕНКО, Борис ВАРИНСЬКИЙ, Андрій КАПЛАУШЕНКО.

4. Джерело інформації: Thermodynamic Functions of Chromatographic Retention of Sodium 2-((4-Amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio) acetate and its Impurities. Dmytro Usenko, Borys Varynskyi, Andriy Kaplaushenko. Pharmakeftiki., 2023, Volume 35, Issue 2. P. 32-41.

5. Ким і коли впроваджено: в науковий і учбовий процес кафедрою фармацевтичної хімії ТНМУ ім. І. Я. Горбачевського 20 24 рік. Протокол № 3 від 11 березня 20 24 р.

6. Зауваження та пропозиції: продовжити роботу по аналізу та дослідженню натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату і в тому числі похідних 1,2,4-тріазол-3-тіонів.

Відповідальна за впровадження

Завідувачка кафедри фармацевтичної
хімії, д. фарм. н., проф.

Лілія ЛОГОЙДА

ДОДАТОК А4

**“ЗАТВЕРДЖУЮ”**

Проректор ЗВО з науково-педагогічної
роботи Національного
фармацевтичного університету,
д. фарм. н., проф.

Наталя ПОЛОВКО

” *Наталя Половко* 20 25 р.**Акт впровадження**

- 1. Найменування для впровадження:** Спосіб кількісного визначення натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату.
- 2. Ким запропоновано:** Запорізьким державним медико-фармацевтичним університетом, кафедрою фізколоїдної та аналітичної хімії.
- 3. Автори:** Дмитро УСЕНКО, Андрій САФОНОВ, Борис ВАРИНСЬКИЙ, Андрій КАПЛАУШЕНКО.
- 4. Джерело інформації:** Патент на винахід 127442 Україна, МПК G01N 30/00 (2023.01). Спосіб кількісного визначення натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату / Усенко Д. Л., Сафонов А. А., Варинський Б. О., Каплаушенко А. Г. № а 2021 04603; заявк. 09.08.2021; публ. 23.08.2023, бюл. №32.
- 5. Ким і коли впроваджено:** в науковий і навчальний процес кафедрою загальної хімії НФаУ. Протокол № 3 від 23 жовтня 2025 р.
- 6. Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу по аналізу та дослідженню натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату і в тому числі похідних 1,2,4-триазол-3-тіонів.

Відповідальний за впровадження
Завідувач кафедри загальної хімії,
д. фарм. н., професор

Сергій КОЛІСНИК

ДОДАТОК А5.1

"Затверджую"



проректор закладу вищої освіти
з науково-педагогічної роботи
та післядипломної освіти

Олександр НАЗАРЧУК

"23" грудня 2025 р.

Акт впровадження

Назва роботи: Дослідження стресової деградації і визначення стабільності субстанції та ін'єкційного розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетату

Автори: Дмитро УСЕНКО, Андрій КАПЛАУШЕНКО

Установа-розробник : Запорізький державний медико-фармацевтичний університет; 69035 м. Запоріжжя, бульвар Марії Примаченко, 26; кафедра фізикоїдної та аналітичної хімії.

Джерело інформації: D. L. Usenko, A. H. Kaplaushenko. «STUDY OF STRESS DEGRADATION AND DETERMINATION OF THE STABILITY OF THE SUBSTANCE AND INJECTION SOLUTION OF SODIUM 2-((4-AMINO-5-THIOPHEN-2-YLMETHYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO)ACETATE» // Odesa Medical Journal. 2024, Volume 2024, Issue 2, P. 85-59.

Назва кафедри (підрозділу), де відбулось впровадження: кафедра фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова

Актуальність дослідження: пошук потенційних ліків серед похідних 1,2,4-тріазол-3-тіону та створення на їх основі лікарських форм є актуальним, оскільки вони демонструють різноманітні біологічні властивості.

Форма впровадження: у наукову роботу та у навчальний процес

Суть впровадження: поглиблення знань здобувачів освіти із процедур визначення стабільності субстанції та ін'єкційного розчину натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

ДОДАТОК А5.2

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної хімії
Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова,
протокол № 3 від 23.10.25 р.

Початок впровадження: листопад 2025 року

Зауваження та пропозиції: продовжити роботу по аналізу та дослідженню
натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату і в
тому числі похідних 1,2,4-тріазол-3-іонів.

Соціально-економічний ефект: досліджено деградацію під впливом стресу та
обґрунтовано умови зберігання та терміни придатності субстанції та
ін'єкційного розчину натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-
3-іл)тіо)ацетату.

Відповідальний за впровадження
Завідувач кафедри фармацевтичної хімії,
доцент ЗВО

Тетяна ЮЩЕНКО

ДОДАТОК А6

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи
ДНП «Львівський національний
медичний університет
імені Данила Галицького»
д. мед. н., проф.,
Вікторія СЕРГІЄНКО
13.12 2025 р.

Акт впровадження

1. Найменування для впровадження: THE RESEARCH PHARMACOKINETIC PARAMETERS AND METABOLISM OF SODIUM 2-((4-AMINO-5-(THIOPHEN-2-YLMETHYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO)ACETATE FOR USE IN MILITARY AND CIVILIAN MEDICINE.

2. Ким запропоновано: Запорізьким державним медико-фармацевтичним університетом, кафедрою фізколоїдної та аналітичної хімії.

3. Автори: Дмитро УСЕНКО, Борис ВАРІНСЬКИЙ, Андрій КАПЛАУШЕНКО, Андрій САФОНОВ, Олександр ПАНАСЕНКО, Любов МОРОЗОВА, Олександр ШМАТЕНКО, Андрій СОЛОМЕННИЙ.

4. Джерело інформації: D. L. Usenko, B. O. Varynskyi, A. G. Kaplaushenko, A. A. Safonov, O. I. Panasenko, L. P. Morozova, O. P. Shmatenko, A. M. Solomennyi. «THE RESEARCH PHARMACOKINETIC PARAMETERS AND METABOLISM OF SODIUM 2-((4-AMINO-5-(THIOPHEN-2-YLMETHYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO)ACETATE FOR USE IN MILITARY AND CIVILIAN MEDICINE» // Український журнал військової медицини. 2024, Том 5 (4), ст. 159-167.

5. Ким і коли впроваджено: в науковий процес кафедрою загальної, біонеорганічної, фізколоїдної хімії ДНП «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького»
Протокол № 3 від 14 грудня 2025 р.

6. Зауваження та пропозиції: продовжити роботу по аналізу та дослідженню натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату і в тому числі похідних 1,2,4-тріазол-3-тіонів.

Відповідальна за впровадження

Завідувачка кафедри
загальної, біонеорганічної,
фізколоїдної хімії
д. фарм. н., проф.


Ірина ДРАПАК

ДОДАТОК А7



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Запорізького державного
медико-фармацевтичного університету
д. мед. н., професор
Валерій ТУМАНСЬКИЙ
«25» листопада 2025 р.

Акт впровадження

1. Найменування для впровадження: Визначення ізотонічності 1 % розчину натрію 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.
2. Ким запропоновано: Запорізьким державним медико-фармацевтичним університетом, кафедрою фізикоїдної та аналітичної хімії.
3. Автори: Дмитро УСЕНКО, Андрій КАПЛАУШЕНКО, Борис ВАРИНСЬКИЙ.
4. Джерело інформації: Визначення ізотонічності 1 % розчину натрію 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.* 2024. Т. 17. №1(44). С. 31-34.
5. Ким і коли впроваджено: в науковий та навчальний процес кафедрою токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМФУ, 2025 рік, протокол засідання кафедри № 5 від «25» листопада 2025 року.
6. Зауваження та пропозиції: продовжити роботу по аналізу та дослідженню натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату і в тому числі похідних 1,2,4-тріазол-3-іонів.

Відповідальний за впровадження

д. фарм. н., професор,
завідувач кафедри
токсикологічної та неорганічної
хімії ЗДМФУ

Олександр ПАНАСЕНКО

ДОДАТОК А8

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи

Запорізького державного

медико-фармацевтичного університету

д. мед. н., професор

Валерій ТУМАНСЬКИЙ

«28» _____ 2025р.

Акт впровадження

1. Найменування для впровадження: Thermodynamic Functions of Chromatographic Retention of Sodium 2-((4-Amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio) acetate and its Impurities.

2. Ким запропоновано: Запорізьким державним медико-фармацевтичним університетом, кафедрою фізикоїдної та аналітичної хімії.

3. Автори: Дмитро УСЕНКО, Борис ВАРИНСЬКИЙ, Андрій КАПЛАУШЕНКО.

4. Джерело інформації: Thermodynamic Functions of Chromatographic Retention of Sodium 2-((4-Amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio) acetate and its Impurities. Dmytro Usenko, Borys Varynskyi, Andriy Kaplaushenko. Pharmakeftiki., 2023, Volume 35, Issue 2. P. 32-41.

5. Ким і коли впроваджено: в науковий та навчальний процес кафедрою фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії ЗДМФУ, 2025 рік, протокол засідання кафедри № 9 від «28» чэрвня 2025 року.

6. Зауваження та пропозиції: продовжити роботу по аналізу та дослідженню натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату і в тому числі похідних 1,2,4-тріазол-3-тіонів.

Відповідальна за впровадження

д. фарм. н., професор,

зав. кафедри фармацевтичної,

органічної та біоорганічної хімії ЗДМФУ

Людмила КУЧЕРЕНКО

ДОДАТОК Б

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Усенко, Д. Л., Каплаушенко, А. Г., & Варинський, Б. О. (2024). Визначення ізотонічності 1% розчину натрію 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*, 17, 1(44), 31-34. URL: <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2024.1.292556> (Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз та інтерпретація даних дослідження, обговорення результатів та підготовка оригінального тексту статті; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, написання та редагування, остаточне затвердження статті).
2. Usenko, D. L., & Kaplaushenko, A. G. (2024). Study of stress degradation and determination of the stability of the substance and injection solution of sodium 2-((4-amino-5-thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate. *Одеський медичний журнал*, 2(187), 85-89. URL: <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2024-2-15> (Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз та інтерпретація даних дослідження, обговорення результатів, підготовка та написання оригінального тексту статті; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, редагування, остаточне затвердження статті).
3. Usenko, D. L., Varynskyi, B. O., Kaplaushenko, A. G., Safonov, A. A., Panasenko, O. I., Morozova, L. P., Shmatenko, O. P., & Solomennyi, A. M. (2024). The research of pharmacokinetic parameters and metabolism of sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate for use in military and civilian medicine. *Український журнал військової медицини*, 5(4), 159-167. URL: [https://doi.org/10.46847/ujmm.2024.4\(5\)-159](https://doi.org/10.46847/ujmm.2024.4(5)-159) (Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз та інтерпретація даних дослідження, обговорення результатів та підготовка оригінального тексту статті).

статті; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, написання та редагування, остаточне затвердження статті; Сафонов А. А. – концепція дослідження, збір даних; Панасенко О. І. – концепція та дизайн дослідження; Морозова Л. П. – написання, редагування та остаточне затвердження статті; Шматенко О. П. – написання, редагування та остаточне затвердження статті; Соломенний А. М. – редагування та остаточне затвердження статті).

4. Усенко, Д. Л., Сафонов, А. А., Варинський, Б. О., Каплаушенко, А. Г. (2023). Спосіб кількісного визначення натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату (Патент на винахід № 127442). Укрпатент. URL:

<https://base.nipo.gov.ua/searchbulletin/search.php?action=viewdetails&dbname=invc&IdClaim=286029> (Дисертантом виконано експериментальне дослідження, аналіз наукової літератури та патентний пошук за направленням, підготовлено заявку до реєстрації в Укрпатенті; Сафонов А. А. – концепція дослідження; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, остаточне затвердження).

5. Usenko, D. L., Varynskyi, B. O., & Kaplaushenko, A. H. (2023). Thermodynamic Functions of Chromatographic Retention of Sodium 2-((4-Amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1, 2, 4-triazol-3-yl) thio) acetate and its Impurities. *Pharmakeftiki*, 35, II, 32-41. URL: https://www.hsmc.gr/wp-content/uploads/2015/12/farmakeftiki_2_2023.pdf (Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз результатів дослідження, обговорення результатів та підготовка оригінального тексту статті; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, написання та редагування, остаточне затвердження статті).

6. Усенко, Д. Л., Сафонов, А. А., Варинський, Б. О., Каплаушенко, А. Г. (2022). Дослідження прискореної деградації натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату. Науково-технічний прогрес і

оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали ІХ наук.-практ. конф. з міжнар.участю (22 - 23 вересня 2022 р.) (с. 92-93). ТНМУ, Тернопіль, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Сафонов А. А. – концепція дослідження; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

7. Усенко, Д. Л., Варинський Б. О., Каплаушенко А. Г. (2023). Визначення стабільності ін'єкційного розчину натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в ампулах методом "прискороного старіння". Безперервний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи: матер. наук.-практ. конференції з міжнар. участю, присвяченої 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету (1-2 листопада 2023 р.) (с. 235). НФаУ, Харків, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

8. Усенко, Д. Л., Варинський Б. О., Каплаушенко А. Г. (2023). Вивчення фармакокінетичних параметрів натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в сироватці крові щурів. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2023» (23-24 листопада 2023 р.) (с. 134). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Варинський Б. О. – розробка концепції та дизайну дослідження; Каплаушенко А. Г. – курація, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

9. Усенко, Д. Л. (2024). Прогнозування, ідентифікація та хеометричний пошук метаболітів натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметіл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Тези доповідей 93 науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації» (28-30 березня 2024 р.) (с. 22). ІФНМУ, Івано-Франківськ, Україна. *(Дисертантом здійснено літературний пошук, експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, обговорення результатів та підготовка тез до друку).*

10. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Термодинамічні характеристики обернено-фазового хроматографічного утримання натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали X наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої пам'яті зав. каф. управління та економіки фармації з технологією ліків, д-ра фарм. наук, проф. Т.А. Грошового (17-18 жовтня 2024 р.) (с. 195). ТНМУ, Тернопіль, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

11. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Розробка методики детектування комплексу супутніх домішок натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою ВЕРХ-МС. Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації (Topical issues of clinical pharmacology and clinical pharmacy): матеріали наук.-практ. internet-конф. з міжнар. участю (29-30 жовтня 2024 р.) (с. 271). НФаУ, Харків, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

12. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Валідація методики визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою ВЕРХ-МС. Матеріали XII Науково-практичної конференції з міжнародною участю Школи молодих науковців АТ «Фармак» «НАУКА, ІННОВАЦІЇ ТА ЯКІСТЬ В СУЧАСНОМУ ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ» (28-29 листопада 2024 р.) (с. 100-101). АТ «Фармак», Київ, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

13. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2024). Розробка та оптимізація умов ВЕРХ-МС детектування натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в комплексі з супутніми домішками. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2024» (21-22 листопада 2024 р.) (с. 119-120). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

14. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2025). Вивчення закономірностей мас-спектрометричного розпаду АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його супутніх домішок. VII науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (15 травня 2025 р.) (с. 304-305). НФаУ, Харків, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

15. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2025). Оцінка впливу на навколишнє середовище ВЕРХ методики кількісного визначення АФІ натрій 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія: збірник тез II Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 95-річчю Київського національного університету технологій та дизайну (30-31 жовтня 2025 р.) (с. 125). КНУТД, Київ, Україна. *(Дисертантом здійснено in silico дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

16. Усенко, Д. Л., Каплаушенко А. Г. (2025). Аналітичний супровід АФІ та лікарської форми на основі натрію 2-((4-аміно-5-тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою ВЕРХ та ВЕРХ-МС. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2025» (20-21 листопада 2025 р.) (с. 140-141). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна. *(Дисертантом здійснено експериментальне дослідження, аналіз даних дослідження, написання та підготовка тез до друку; Каплаушенко А. Г. – розробка концепції та дизайну дослідження, обговорення результатів, остаточне затвердження тез).*

ДОДАТОК В

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: IX наук.-практ. конф. з міжнар. участю (22-23 вересня 2022 р.). ТНМУ, Тернопіль, Україна. *(публікація тез та усна доповідь на конференції).*

2. Безперервний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи: наук.-практ. конференція з міжнар. участю, присвячена 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету (1-2 листопада 2023 р.). НФаУ, Харків, Україна. *(публікація тез та усна доповідь на конференції).*

3. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2023» (23-24 листопада 2023 р.). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна. *(публікація тез та усна доповідь на конференції).*

4. 93 науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «ІННОВАЦІЇ В МЕДИЦИНІ ТА ФАРМАЦІЇ» (28-30 березня 2024 р.). ІФНМУ, Івано-Франківськ, Україна. *(публікація тез).*

5. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: X наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвячена пам'яті зав. каф. управління та економіки фармації з технологією ліків, д-ра фарм. наук, проф. Т.А. Грошового (17-18 жовтня 2024 р.). ТНМУ, Тернопіль, Україна. *(публікація тез та усна доповідь на конференції).*

6. Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації (Topical issues of clinical pharmacology and clinical pharmacy): наук.-практ. internet-конф. з міжнар. участю (29-30 жовтня 2024 р.). НФаУ, Харків, Україна. *(публікація тез та усна доповідь на конференції).*

7. XII Науково-практична конференція з міжнародною участю Школи молодих науковців АТ «Фармак» «НАУКА, ІННОВАЦІЇ ТА ЯКІСТЬ В СУЧАСНОМУ ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ» (28-29 листопада 2024 р.). АТ «Фармак», Київ, Україна. *(публікація тез)*.

8. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2024» (21-22 листопада 2024 р.). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна. *(публікація тез)*.

9. VII науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «ВІД ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТА КЛІНІЧНОЇ ПАТОФІЗІОЛОГІЇ ДО ДОСЯГНЕНЬ СУЧАСНОЇ МЕДИЦИНИ І ФАРМАЦІЇ» (15 травня 2025 р.). НФаУ, Харків, Україна. *(публікація тез)*.

10. Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія: II Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 95-річчю Київського національного університету технологій та дизайну (30-31 жовтня 2025 р.). КНУТД, Київ, Україна. *(публікація тез та усна доповідь на конференції)*.

11. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум - 2025» (20-21 листопада 2025 р.). ЗДМФУ, Запоріжжя, Україна. *(публікація тез та усна доповідь на конференції)*.

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 11:52:55 23.01.2026

Назва файлу з підписом: Дисертація PhD Дмитро УСЕНКО.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 5.0 МБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Дисертація PhD Дмитро УСЕНКО.pdf
Розмір файлу без підпису: 6.3 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Усенко Дмитро Леонідович

П.І.Б.: Усенко Дмитро Леонідович

Країна: Україна

РНОКПП: 3622205773

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 11:52:45 23.01.2026

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF97040000009B34F500261C4A04

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Алгоритм підпису: ДСТУ 4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)

Формат підпису: З повними даними для перевірки (XAdES-B-LT)

Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2025.08.25 13:00