

Б. О. Варинський

Запорізький державний медичний університет, Україна
69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26. E-mail: varinsky@zsmu.zp.ua

ВЕРХ-МС дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату

Мета. Вивчити фармакокінетику потенційного активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ) морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові щурів при внутрішньочеревному введенні.

Результати та їх обговорення. ВЕРХ-МС методика визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові нелінійних щурів було адаптовано для дослідження фармакокінетики. Доведено, що при використанні метанолу для осадження білків спостерігаються високі показники вилучення АФІ з плазми крові. Вимірювання концентрації досліджуваної лікарської речовини в плазмі крові на різних інтервалах часу після введення дало змогу побудувати фармакокінетичну криву та розрахувати відповідні фармакокінетичні параметри.

Експериментальна частина. Рідинно-хроматографічна система Agilent 1260 Infinity складалася з дегазатора, бінарного насоса, автосамплера, термостату колонки, діодно-матричного детектора, одноквадрупольного мас-спектрометричного детектора (Agilent 6120). Дослідження фармакокінетики проведене на статевозрілих білих нелінійних щурах обох статей. Активний фармацевтичний інгредієнт, морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетат вводили в ізотонічному розчині внутрішньочеревно при дозуванні 50 мг/кг.

Висновки. Побудовано фармакокінетичну криву та розраховано фармакокінетичні параметри морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові при його внутрішньочеревному введенні.

Ключові слова: рідинна хроматографія; 1,2,4-триазоли; фармакокінетика

B. O. Varynskyi

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

The HPLC-MS determination of pharmacokinetic parameters of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate

Aim. To study pharmacokinetic parameters of the potential active pharmaceutical ingredient (API) morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in the blood plasma of rats when administered intraperitoneally.

Results and discussion. The HPLC-MS method of determination of morpholinium 2-((4-(2-methoxy)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in the blood plasma of non-linear rats has been adopted to study of pharmacokinetic parameters of the compound. It has been proven that high levels of API extraction from the blood plasma when using methanol for protein precipitation were observed. The measurement of the concentration of the drug substance studied in the blood plasma at different time intervals after injection allowed us to plot the pharmacokinetic curve and calculate the pharmacokinetic parameters.

Experimental part. The Agilent 1260 Infinity liquid chromatography system consisted of a degasser, binary pump, autosampler, column thermostat, diode-matrix detector, single-quadrupole mass spectrometric detector (Agilent 6120). The pharmacokinetic study was performed in sexually mature white nonlinear rats of two sexes. The active pharmaceutical ingredient morpholinium 2-((4-(2-methoxy)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate, was administered in the isotonic solution intraperitoneally in the dose of 50 mg/kg.

Conclusions. The pharmacokinetic curve has been plotted, and the pharmacokinetic parameters of morpholinium 2-((4-(2-methoxy)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in the blood plasma when administered intraperitoneally have been calculated.

Key words: liquid chromatography; 1,2,4-triazoles; pharmacokinetics

Copyright © 2020, B. O. Varynskyi

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

Похідні 1,2,4-триазол-3-тіолу володіють різноманітною біологічною активністю [1]. Так, морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетат є активним фармацевтичним інгредієнтом потенційного лікарського засобу «Тіометризол», який знаходиться на етапі реєстрації. Цей препарат виявляє адаптогенні

властивості, має антиоксидантний і протиішемічний механізм дії [2, 3].

Дослідження фармакокінетики має велике значення на етапах створення та впровадження активних фармацевтичних інгредієнтів. Раніше було проведено дослідження фармакокінетики тіометризолу на кролях при внутрішньовенному вве-

денні за допомогою спектрофотометрії в УФ-області спектра [4], але цей метод є неселективним, малочутливим і не дозволяє зробити правильний висновок про концентрацію речовини в певний момент часу.

Сучасна фармацевтична наука і практика рекомендує застосовувати селективні хроматографічні та хромато-мас-спектрометричні методи, що дозволяють вибірково з достатньою чутливістю, швидкістю та достовірністю визначати концентрації лікарських речовин у біологічних рідинах, а саме в плазмі крові, сечі тощо. Останні десятиріччя ВЕРХ та ВЕРХ-МС, зокрема УВЕРХ-МС, перетворились на «золотий стандарт» у фармацевтичних дослідженнях, особливо в дослідженнях адсорбції, розподілу, метаболізму та екскреції лікарських речовин [5–7].

Визначенню фармакокінетики за допомогою ВЕРХ та ВЕРХ-МС присвячено велику кількість робіт [8–10]. Результати дослідження метаболізму морфоліній 2-((4-(2-метоксибеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату було наведено в роботі [11].

Метою даної роботи було адаптувати високо-селективну, високочутливу методику дослідження метаболізму морфоліній 2-((4-(2-метоксибеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату, описану в роботі [11], для кількісного визначення АФІ в плазмі крові щурів та провести за її допомогою вивчення фармакокінетики.

Результати та їх обговорення

Для кількісного визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксибеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові щурів було адаптовано хромато-мас-спектрометричні умови та методику прободготовки, що було застосовано для дослідження метаболізму зазначеної речовини [11]. Для вивчення фармакокінетики і метаболізму в плазмі крові при внутрішньочеревному введенні засобу було запропоновано використовувати гідрофільну хроматографію, оскільки метаболіти звичайно мають більш гідрофільну природу, ніж вихідні речовини, і тому вони повинні краще утримуватись на цьому сорбенті і легше відділятися від основної сполуки. Для цього було використано силікагельну колонку Zorbax Rx-Sil. Як елюент застосовували суміш 0,1% HCOOH в ацетонітрилі з додаванням 100 ммоль/л HCOONH₄. У цьому випадку на відміну від оберненофазної хроматографії в утриманні аналітів можуть відігравати важливу роль силанольні групи, і таким чином полярні аналіти можуть краще утримуватись на колонці за рахунок іон-дипольних, диполь-дипольних або водневих зв'язків.

Оптимізація умов прободготовки

Для підготовки зразків плазми крові для аналізу за допомогою рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням найчастіше використовують осадження білків [8]. Як осаджувачі тестували чотири різних розчинники: ацетонітрил, метанол, пропанол-2 та диметилсульфоксид. Як критерій їх ефективності використовували ступінь екстракції. Для розрахунку ступеня екстракції проводили визначення площ піків аналіту для екстрагованих та неекстрагованих зразків плазми крові. Ступінь екстракції розраховували за формулою:

$$R \% = \frac{S_{ex}}{S_{nex}} \cdot 100\%,$$

де: S_{ex} – площа піку аналіту для екстрагованого зразка; S_{nex} – площа піку аналіту для неекстрагованого зразка.

Діаграму ступенів вилучення для різних екстрагентів наведено на рис. 1, при цьому з аналізу даних можна зробити висновок, що найбільший ступінь вилучення спостерігається для метанолу, який і було обрано як розчинник для осадження білків. Для підвищення ступеня осадження білків також було додано 20 мкл 60% кислоти перхлорної.

Визначення фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксибеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату

Концентрацію морфоліній 2-((4-(2-метоксибеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату визначали впродовж 7,5 годин. Нами використано логарифмічну шкалу для визначення інтервалів часу взяття зразків плазми крові, при цьому були застосовані однакові логариф-

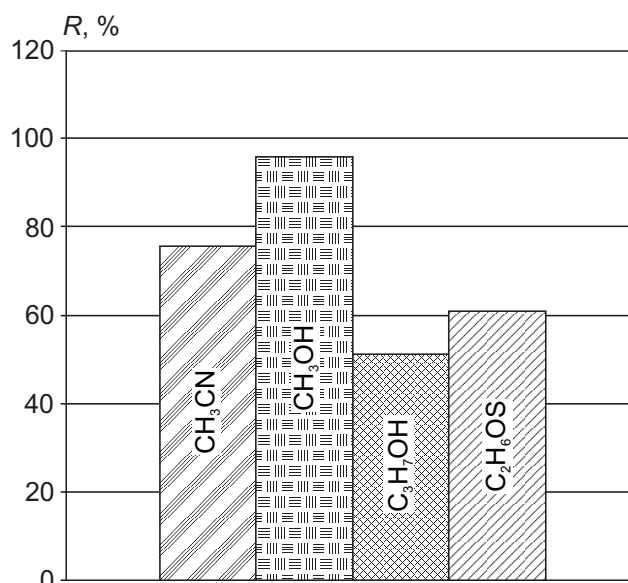


Рис. 1. Діаграма ступеня вилучення АФІ із зразків плазми крові для різних екстрагентів

Таблиця 1

Розрахунок часу отримання зразків плазми після введення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату

\log_{10} (години)	0,9	0,4	-0,1	-0,6	-1,1
$10^{\log_{10}(\text{години})}$, годин	7,5	2,5	0,75	0,25	0,08

мічні інтервали часу: 0,5 (табл. 1). Раніше таку послідовність часу було запропоновано в роботах [12, 13].

Хроматографували кожен зразок плазми крові тричі через 5, 15, 45 хвилин, 2,5, 7,5 годин після введення. Хроматограми наведено на рис. 2–6.

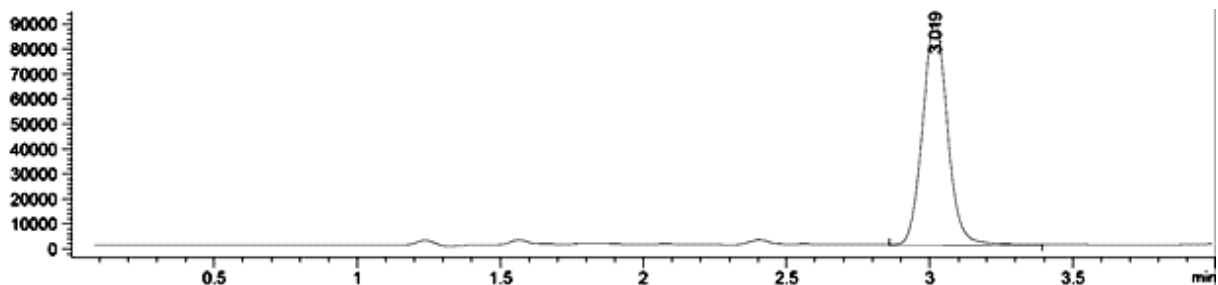


Рис. 2. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 5 хв

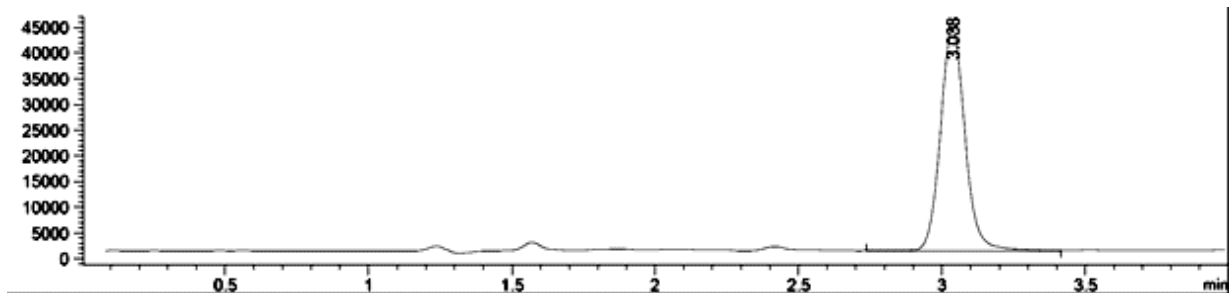


Рис. 3. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 15 хв

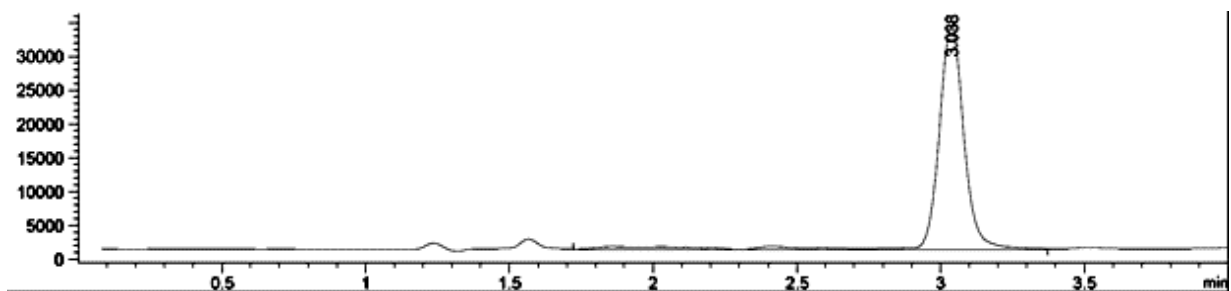


Рис. 4. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 45 хв

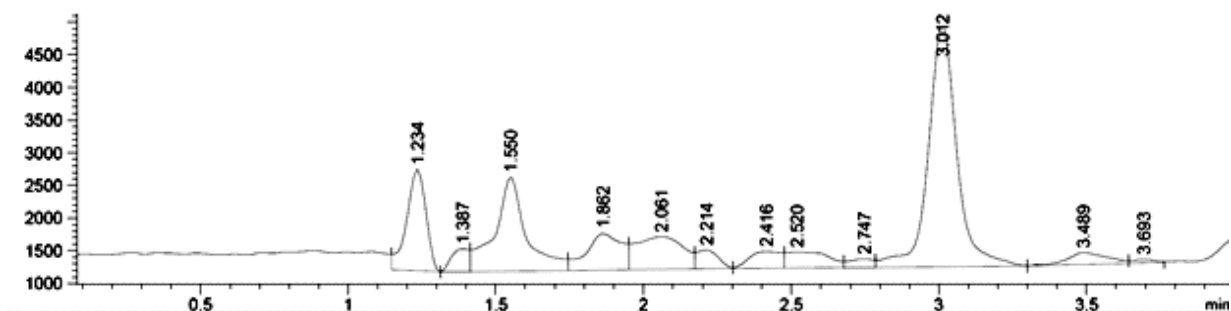


Рис. 5. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 2,5 год

Концентрацію морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові розраховували за рівнянням калібрувального графіка (рис. 7).

Хроматограму нижчого калібрувального розчину наведено на рис. 8. Концентрації морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові наведено у табл. 2.

Результати розрахунку фармакокінетичних параметрів наведено в табл. 3.

Фармакокінетичну криву, побудовану в координатах час–концентрація морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату, наведено на рис. 9.

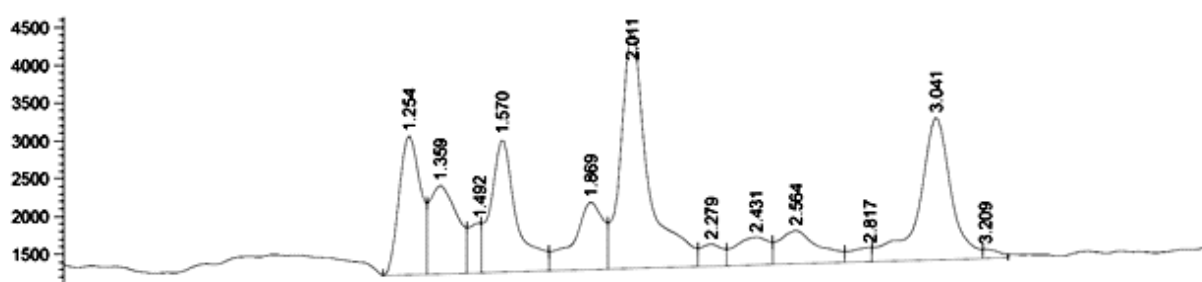


Рис. 6. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 7,5 год

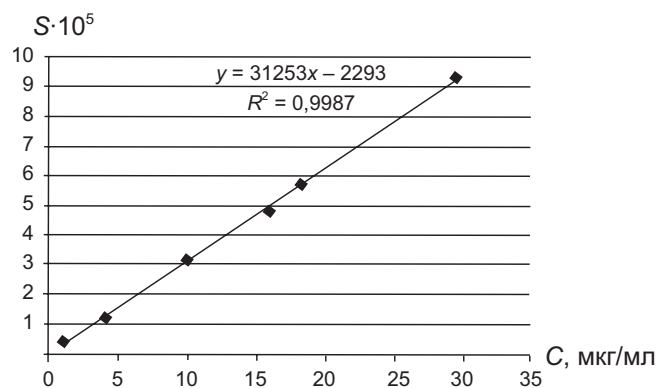


Рис. 7. Калібрувальна крива

Таблиця 2

Концентрації морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові, мкг/мл

C, мкг/мл	19,97	15,38	8,103	0,934	0,4252
Δt, год	0,08	0,25	0,75	2,5	7,5

Експериментальна частина

Визначення фармакокінетичних параметрів. Дослідження проводили на статевозрілих білих нелінійних щурах двох статей масою 180–220 г. Щурів отримували з Державного інституту фармакології та токсикології Національної академії медичних наук України. Під час експерименту тварини мали доступ до їжі та води. Активний фармацевтичний інгредієнт морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-три-

Таблиця 3

Фармакокінетичні параметри морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату

Показник	Значення
AUC, мкг·год/мл	21,80
K, год ⁻¹	0,5188
t _{1/2t} , год	1,336
Cl, л/год·кг	7,523
V _d , л/кг	14,50

азол-3-іл)тіо)ацетат вводили в ізотонічному розчині з концентрацією 5 мг/мл внутрішньочеревно при дозуванні 50 мг/кг [3]. Після анестезії за допомогою діетилового етеру кров збирали з біфуркації аорти. Для отримання плазми кров центрифугували зі швидкістю 3000 об/хв. Розраховували такі фармакокінетичні параметри:

1) *площа під фармакокінетичною кривою «концентрація–час» AUC, яка є фармакокінетичним параметром, що характеризує біодоступність лікарського засобу; розраховували за формулою:*

$$AUC = \frac{c_1}{2} \cdot \Delta t_1 + \frac{c_1 + c_2}{2} \cdot \Delta t_2 + \frac{c_2 + c_3}{2} \cdot \Delta t_3 + \dots + AUC_{rem}, \text{ мкл} \cdot \text{год} / \text{мл}$$

2) *загальний кліренс Cl відповідає об'єму плазми, з якого речовина повністю видаляється за одиницю часу (D – доза):*

$$Cl = \frac{D}{AUC}, \text{ л} \cdot \text{год} / \text{кг}$$

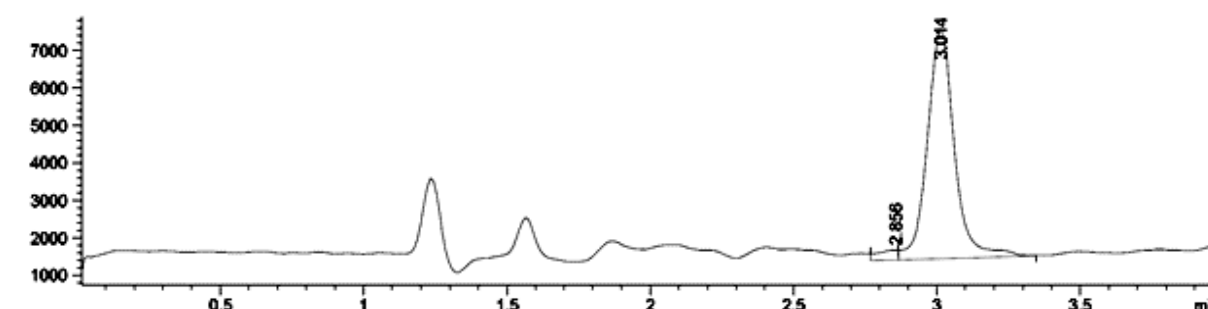


Рис. 8. Хроматограма нижчого калібрувального розчину

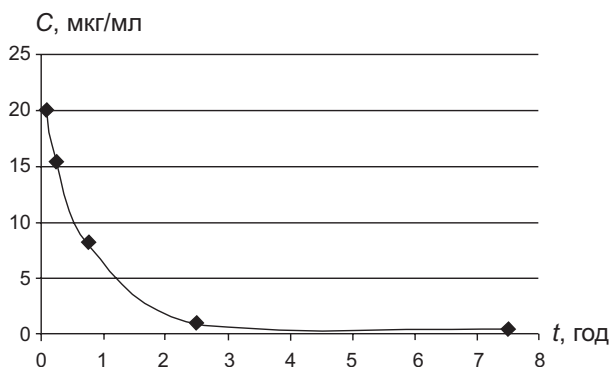


Рис. 9. Фармакокінетична крива залежності концентрації АФІ в плазмі крові від часу

3) константа швидкості елімінації K , що характеризує зниження концентрації речовини у кінці фармакокінетичної кривої, де C_{\max} та T_{\max} – максимальна концентрація та відповідний час, C_{rem} та T_{rem} – поточна концентрація та відповідний час:

$$K = \frac{\ln \frac{C_{\max}}{C_{rem}}}{T_{rem} - T_{\max}}, \text{ год}^{-1}$$

4) об'єм розподілення V_d , що є теоретичним об'ємом, який необхідний, щоб містити загальну кількість введеного препарату в тій самій концентрації, в якій він спостерігається у плазмі крові:

$$V_d = \frac{Cl}{K}, \text{ л/кг}$$

5) біологічний період напіввиведення $t_{1/2}$ показує час, впродовж якого концентрація досліджуваної речовини в крові зменшується вдвічі:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}, \text{ год}$$

Хроматографічні умови. Хроматографічне розділення проводили за допомогою хроматографічної системи Agilent 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies, Germany), яка складалася з дегазатора, бінарного насоса, автосамплера, термостату колонки, діодно-матричного детектора. Колонка ZORBAX Rx-Sil (50 × 4,6, 1,8 мкм). Температура колонки дорівнювала 40°C. Рухома фаза складалась із 80% ацетонітрилу (із 0,1% HCOOH) та 20% води (із 100 мМ HCOONH₄). Швидкість потоку складала 0,400 мл/хв [11]. Хроматограми були записані та оброблені за допомогою програмного забезпечення Open LAB CDS. Об'єм інжекції складав 1 мкл.

Умови мас-спектрометричної детекції. Швидкість газу осушувача (азоту) – 12 л/хв. Температура газу осушувача – 350°C, тиск на небулайзері 35 psig. Напруга на фрагменторі 150 В. Визначення проводили в режимі SIM (селективний моніторинг іонів) при m/z 343 [11].

Реагенти. Морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату

тат було синтезовано на кафедрі фізколоїдної хімії Запорізького державного медичного університету. Його структуру підтверджено професором Каплаушенко А. Г. [2].

Високоочищену воду (18 МΩ при 25°C) одержано за допомогою системи Direct Q 3UV (Merk Millipore, Molsheim, France). Ацетонітрил було використано кваліфікації «HPLC Super Gradient» (Avantor Performance Materials Poland S.A., Poland). Форміатну кислоту застосовано кваліфікації «Для аналізу» 98% (AppliChem GmbH, Germany). Амоній ацетат був кваліфікації «Хімічно чистий» ≥ 98% (Китай).

Підготовка зразків плазми крові. До зразків плазми об'ємом 100 мкл додавали 150 мкл води та 1 мл метанолу, 20 мкл 60% кислоти перхлоратної, струшували на вортекс-міксері 1 хвилину, 3 хвилини на ультразвуковій ванні, впродовж 10 хвилин центрифугували при 10000 об/хв.

Виготовлення калібрувальних розчинів. Для цього було приготовлено два вихідних розчини морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату з концентрацією 0,00001 г/мл (розчин А) та 0,00002 г/мл (розчин Б) відповідно. Калібрувальні розчини готували наступним чином. Для виготовлення першого калібрувального розчину брали 10 мкл розчину А та додавали до 100 мкл плазми, наступні калібрувальні розчини готували з розчину Б: відповідно 20, 50, 80, 100, 150 мкл розчину Б додавали до 100 мкл плазми (змішували за допомогою ультразвуку впродовж 15 хв), додавали відповідно 140, 130, 100, 70, 50, 0 мкл води, 1 мл метанолу, 20 мкл 60% кислоти перхлоратної, струшували на вортекс-міксері 1 хв, 3 хв витримували на ультразвуковому огрівнику, впродовж 10 хв центрифугували при 10000 об/хв. Таким чином, було отримано шість калібрувальних розчинів із концентраціями відповідно 1, 4, 10, 16, 18, 30 мкг/мл.

Висновки

1. Визначено, що оптимальні умови осадження білків при визначенні морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові досягаються при використанні метанолу.

2. Швидку, селективну та чутливу ВЕРХ-МС методу визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату адаптовано для кількісного визначення даного АФІ в плазмі крові.

3. Проведено дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові, а саме побудовано фармакокінетичну криву та розраховані фармакокінетичні параметри.

Конфлікт інтересів: відсутній.

References

1. Samelyuk, Yu. G.; Kaplaushenko, A. G. Synthesis, physico-chemical and biological properties of 2-(5-(methoxyphenyl)-1,2,4-triazolo-3-thio)-acetic acid and their esters. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice* **2013**, *2*, 125–128.
2. Kaplaushenko, A. G. The Research of Creating a New Original Domestic Drug Based on 1,2,4-triazole. *Scientific Journal of the Ministry of Health of Ukraine* **2013**, *2*, 115–121.
3. Kaplaushenko, A. G. Synthesis, structure and biological activity of 4-mono-and 4,5-disubstituted 1,2,4-triazole-3-one derivatives. Doctoral Degree Thesis, Zaporizhzhya State Medical University, Zaporizhzhya, 2012.
4. Kaplaushenko, A. G. The study of pharmacokinetics of morpholinium 2-(5-(4-pyridyl)-4-(2-methoxyphenyl)-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetate. *Pharm. J. (Kiev, Ukr.)* **2013**, *6*, 88–92.
5. Lim, C.-K.; Lord, G. Current Developments in LC-MS for Pharmaceutical Analysis. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25* (5), 547–557. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.547>.
6. Cuyckens, F. Mass spectrometry in drug metabolism and pharmacokinetics: Current trends and future perspectives. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2019**, *33* (S3), 90–95. <https://doi.org/10.1002/rcm.8235>.
7. Miroshnichenko, I. I.; Fedotov, Yu. A.; Gorshkova, E. V.; Ivaschenko, A. A. Chromatography mass spectrometry in pharmacokinetic investigations. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika* **2008**, *3*, 29–36.
8. Varynskyi, B. O.; Kaplaushenko, A. G. HPLC and HPLC-MS methods used for drugs analysis in plasma and blood serum; Zaporizhzhya, 2019.
9. Silva, I. R.; Braga, A. V.; Gloria, M. B. d. A.; Machado, R. d. R.; César, I. C.; Oliveira, R. B. Preclinical pharmacokinetic study of a new thiazolyl hydrazone derivative with antifungal activity in mice plasma by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B* **2020**, *1149*, 122180. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122180>.
10. Logoyda, L.; Kovalenko, S.; Gaafar, M.; Abdel-Megied, A. M.; Elbarbry, F. A. A validated LC-MS/MS method for the quantification of amlodipine, bisoprolol, enalapril and enalaprilat. Application to pharmacokinetic study in healthy volunteers. *Microchem. J.* **2020**, *155*, 104700. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104700>.
11. Varynskyi, B.; Kaplaushenko, A. 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* **2020**, *33* (2), 72–75. <https://doi.org/10.2478/cipms-2020-0014>.
12. Pruglo, Ye. S. Synthesis and biological properties of 3-S-substituted 5-Alk-(Ar-,Het)-4(H)-R-1,2,4-triazole. Doctoral Degree Thesis, Zaporizhzhya State Medical University, Zaporizhzhya, 2019.
13. Shcherbyna, R. An investigation of the pharmacokinetics and potential metabolites of potassium 2-((4-amino-5-(morpholinometyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate on rats. *Ankara Univ. Eczacilik Fak. Derg.* **2020**, *44* (2), 233–241. <https://doi.org/10.33483/jfpau.681611>.

Received: 30. 06. 2020

Revised: 08. 08. 2020

Accepted: 27. 08. 2020