

Д. Л. Усенко, А. Г. Каплаушенко
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
ORCID: 0000-0001-7593-5482
SCOPUS: 58508823600
ORCID: 0000-0003-3704-5539
SCOPUS: 56359267100

ВАЛІДАЦІЯ ТА ОЦІНКА ПРОФІЛЮ ВЕРХ – МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АФІ НАТРІЙ 2-((4-АМІНО-5-ТІОФЕН-2-ІЛМЕТИЛ)-4Н-1,2,4-ТРІАЗОЛ-3-ІЛ)ТІО)АЦЕТАТУ

Вступ. Похідні 1,2,4-тріазолу посідають важливе місце серед сучасних біологічно активних сполук завдяки широкому спектру фармакологічних властивостей. Особливий інтерес становить натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат, перспективний активний фармацевтичний інгредієнт з доведеною акто- та стреспротекторною дією, упровадження якого у фармацевтичну практику потребує надійних аналітичних методів контролю якості.

Мета дослідження – валідація швидкої, точної і екологічно обґрунтованої ВЕРХ-методики кількісного визначення натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції.

Методи дослідження. Дослідження проводили методом високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричним детектором (ВЕРХ-ДМД) з використанням системи «Agilent 1260 Infinity». Аналіз здійснювали в ізократичному режимі на колонці «Zorbax SB-C18» з використанням рухомої фази вода – ацетонітрил з додаванням 0,1 % мурашиної кислоти. Валідацію методики виконували відповідно до вимог ІСН Q2(R1), Державної фармакопеї України та Європейської фармакопеї з оцінюванням чутливості, лінійності, прецизійності, правильності й екологічного профілю (AGREE, GAPI).

Результати й обговорення. Встановлено нижню межу кількісного визначення на рівні 10 мкг/мл за співвідношення сигнал/шум 12,6. Методика продемонструвала високу лінійність у діапазоні 80–120 % від номінальної концентрації ($R = 0,9981$), прецизійність ($RSD \leq 2 \%$) та правильність (середній відсоток вилучення 100,26 %). Оцінювання за концепцією «зеленої» аналітичної хімії показало прийнятний екологічний профіль розробленої методики (AGREE = 0,74).

Висновки. Розроблена та валідована ВЕРХ-методика є швидкою, чутливою, точною, відтворюваною та екологічно обґрунтованою. Вона може бути рекомендована для контролю якості субстанції натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та використання на етапах фармацевтичного розроблення і стандартизації перспективних лікарських засобів на основі даного АФІ.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: 1,2,4-тріазол; АФІ; ВЕРХ; валідація; кількісне визначення; субстанція; зелена аналітична хімія.

ВСТУП. Сучасний розвиток фармацевтичної науки та медичної практики супроводжується активним пошуком нових ефективних і безпечних активних фармацевтичних інгредієнтів. У цьому контексті похідні 1,2,4-тріазолу посідають особливе місце, оскільки характеризуються широким спектром біологічної активності та залишаються об'єктом інтенсивних досліджень упродовж останніх років [1–9]. Встановлено, що сполуки даного класу проявляють протигрибкові, протипухлинні, антиоксидантні, гепатопротекторні та противірусні властивості, а також демонструють значний протираковий потенціал [1–9]. Практичну цінність похідних 1,2,4-тріазолу

підтверджує успішне застосування в медичній і ветеринарній практиці таких препаратів, як Тіотріазолін, Трифузол, Авесстим і Тіометрізол.

Особливий науковий інтерес становить натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат – новий активний фармацевтичний інгредієнт із доведеною акто- та стреспротекторною дією [10]. Його фармакологічний ефект пов'язаний зі стабілізацією клітинних мембран, зниженням рівня оксидативного стресу та підвищенням стійкості організму до гіпоксичних і токсичних чинників. З огляду на потенціал даного активного фармацевтичного інгредієнта (далі – АФІ), його впровадження у фармацевтичну практику потребує комплексного

дослідження та розроблення надійних аналітичних методик контролю якості.

Відповідно до вимог Державної фармакопеї України [11–16] та Європейської фармакопеї [17] активний фармацевтичний інгредієнт має контролюватися за вмістом основної речовини та домішок, аналітичні методики мають бути валідовані.

Мета роботи – валідація раніше розробленої методики кількісного визначення натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції із застосуванням методу високоефективної рідинної хроматографії (далі – ВЕРХ) [18].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідженні використано субстанцію АФІ натрій 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, а також стандартний робочий зразок (СРЗ) відповідного АФІ. Якісні та кількісні показники щодо вмісту основної речовини та супутніх домішок закладені в основу проекту методів контролю якості (далі – МКЯ) субстанції натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, розробленого з урахуванням перспектив створення парентеральних лікарських форм [10]. Будову й індивідуальність СРЗ підтверджено методом ^1H ЯМР-спектроскопії, а кількісний вміст основної речовини підтверджено методом неводного потенціометричного титрування [10].

Як розчинники та реагенти використовували ацетонітрил для ВЕРХ-класифікації Super Gradient (Avantor Performance Materials Poland S. A. (Польща)), мурашину кислоту класифікації «For analysis» (98 %) (AppliChem GmbH (Німеччина)) та воду високої очистки (Q3, 18 M Ω , 25 °C).

Хроматографічні дослідження проводили з використанням системи ВЕРХ з діодно-матричним детектором «Agilent 1260 Infinity», оснащеної дегазатором, бінарним насосом, автосамплером, термостатом колонки. Управління процесом аналізу й обробку отриманих даних здійснювали за допомогою ліцензійного програмного забезпечення «Agilent OpenLAB CDS».

Аналіз проводили в ізократичному режимі з використанням рухомої фази А – вода з додаванням 0,1 % мурашиної кислоти, рухомої фази Б – ацетонітрил із 0,1 % мурашиної кислоти у співвідношенні 75:25 (об./об.). Для хроматографічного розділення застосовували колонку «Zorbax SB-C18» (30 · 4,6 мм, розмір часток 1,8 мкм). Температуру колонки підтримували на рівні 40 °C, швидкість

потoku елюента становила 0,4 мл/хв, об'єм інжекції – 2 мкл. Детектування проводили за довжини хвилі 232 нм. Загальна тривалість одного аналізу – 3 хвилини.

Рухому фазу А готували шляхом внесення 1 мл мурашиної кислоти до мірної колби об'ємом 1 000 мл, розчинення у 100 мл води високої очистки з подальшим доведенням об'єму до мітки та ретельним перемішуванням. Аналогічно рухому фазу Б готували з використанням ацетонітрилу як розчинника.

Розчин стандартного робочого зразка з концентрацією 100 мкг/мл готували шляхом розчинення 0,01 г СРЗ у воді високої очистки з доведенням об'єму до 100 мл у мірній колбі класу «А» та ретельним перемішуванням.

Для оцінювання лінійності аналітичної методики було приготовлено дев'ять модельних розчинів субстанції в діапазоні концентрацій 80–120 % щодо номінального вмісту.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Валідаційні характеристики розробленої ВЕРХ-методики визначення натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату оцінювали відповідно до фармакопейних і настанов ІСН, з акцентом на чутливість, прецизійність, лінійність, правильність і екологічний профіль методу.

Нижню межу кількісного визначення (LLOQ) встановлювали на основі співвідношення сигнал/шум, яке для кількісного визначення повинно становити ≥ 5 . Аналіз модельного розчину з концентрацією 10 мкг/мл (рис. 1, 2) показав значення $S/N = 12,6$, що суттєво перевищує мінімально допустимий рівень. Відхилення визначеної концентрації від номінальної не перевищувало 20 %, а показники прецизійності відповідали встановленим критеріям, що свідчить про достатню чутливість методики та можливість її застосування для кількісного визначення АФІ в низьких концентраціях.

Прецизійність методу оцінювали за показниками повторюваності та внутрішньолабораторної прецизійності. Повторюваність визначали шляхом багаторазового інjektування того самого розчину субстанції в ідентичних умовах із подальшим розрахунком RSD для площі піку АФІ. Отримані значення RSD не перевищували 2 % (табл. 1), що відповідає вимогам Державної фармакопеї України [11–16] та Європейської фармакопеї [17] і підтверджує високу відтворюваність результатів.

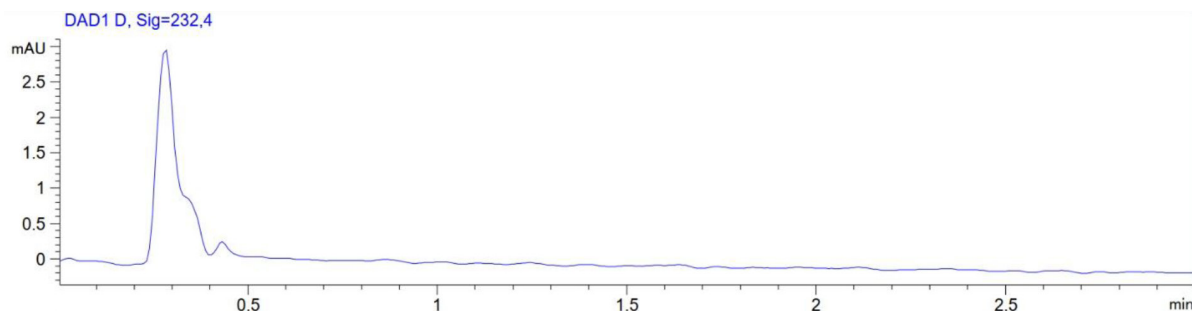


Рис. 1. Хроматограма (ДМД), бланк зразка

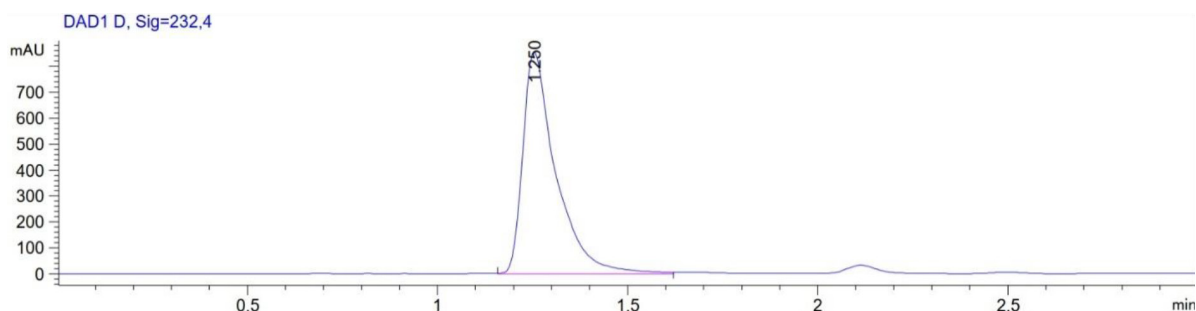


Рис. 2. Хроматограма (ДМД) стандартного робочого розчину АФІ натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за 232 нм на нижній межі кількісного визначення

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

№	Час утримання	Площа піку
	1,25	9 464,73
	1,24	9 579,11
	1,24	9 462,12
	1,25	9 685,87
	1,26	9 667,47
	1,25	9 581,98
Відповідність вимогам ДФУ та ЄФ ($RSD_{max} < 2\%$)		$RSD = \frac{s}{\bar{x}} = \frac{95,7048}{9573,5467} = 1\%$

Таблиця 2 – Результати вивчення внутрішньолабораторної прецизійності ВЕРХ-методики визначення АФІ натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції

№	Час утримання	Площа піку
.	1,26	9 491,17
2	1,25	9 682,97
.	1,24	9 497,27
.	1,25	9 670,39
.	1,25	9 455,08
.	1,25	9 632,42
Відповідність вимогам ДФУ та ЄФ ($RSD_{max} \leq 2\%$)		$RSD = \frac{s}{\bar{x}} = \frac{101,4206}{9571,55} = 1,06\%$

Внутрішньолабораторну прецизійність (табл. 2) перевіряли шляхом повторення експерименту за тиждень, також було отримано значення RSD у межах допустимих нормативів, що свідчить про стабільність методики в часі.

Лінійність методу досліджували в діапазоні концентрацій 8–12 мкг/мл, що відповідає 80–120 % від номінального вмісту АФІ. Калібрувальний графік (рис. 3), побудований за методом зовнішнього стандарту, характеризувався чіткою лінійною залежністю сигналу діодно-матричного детектора від концентрації аналіту. Отримане рівняння регресії $y = 9538,4x + 62,471$ з коефіцієнтом детермінації $R^2 = 0,9981$ підтверджує відмінну лінійність методу для кількісного аналізу в заданому діапазоні.

Правильність методики оцінювали методом аналізу модельних розчинів на трьох рівнях концентрації – 80, 100 і 120 % від номінального значення (табл. 3). Середній відсоток вилучення за всіма серіями становив 100,26 %, що свідчить про високу точність визначення та відсутність систематичної похибки. Значення RSD (0,85 %) було суттєво нижчим за гранично допустиме, що підтверджує надійність і коректність розробленої методики.

Окрім класичних валідаційних параметрів, методику було оцінено з позицій «зеленої» аналітичної хімії. Застосування індексів

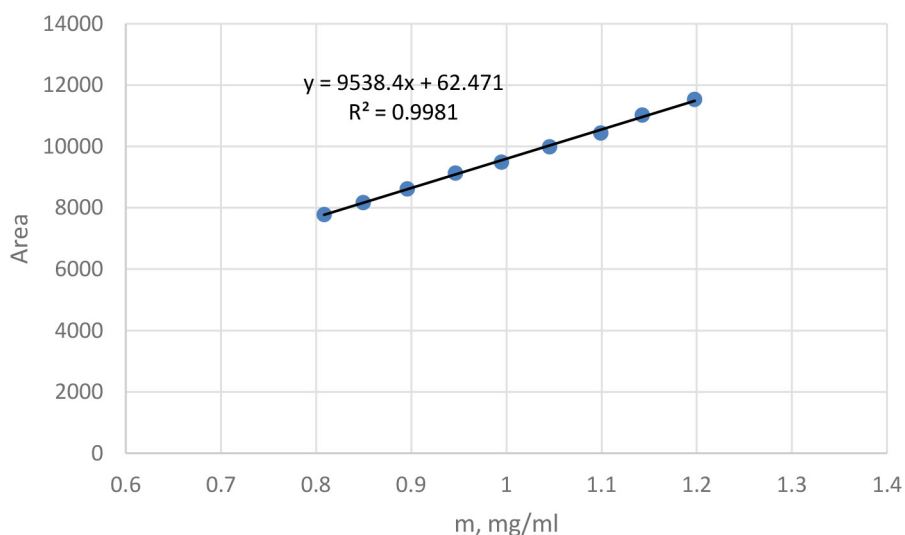


Рис. 3. Калібрувальна крива залежності площі піку сигналу ДМД від вмісту АФІ натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції

AGREE та GAPI дозволило комплексно схарактеризувати екологічний профіль методу (рис. 4). За шкалою AGREE отримано інтегральний бал 0,74, що свідчить про досить високий рівень екологічної безпеки. Аналіз за методом GAPI продемонстрував переважно «зелені» сектори, що вказує на мінімальний негативний вплив більшості етапів аналітичної процедури. Потенційно менш сприятливі показники пов'язані з використанням ацетонітрилу як органічного модифікатора й енергозатратністю ВЕРХ-системи, однак їхній вплив є обмеженим і виправданим з огляду на досягнуті аналітичні характеристики.

ВИСНОВКИ. У результаті проведених досліджень валідовано сучасну ВЕРХ-методику кількісного визначення натрію 2-((4-аміно-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, перспективного АФІ

з доведеними акто- та стреспротекторними властивостями. Методика базується на застосуванні хроматографічної колонки «Zorbax SB-C18» (1,8 мкм), що забезпечує ефективне хроматографічне розділення, високу чутливість і малу тривалість аналізу (3 хв).

Валідація методики проведена відповідно до вимог Державної фармакопеї України та Європейської фармакопеї, підтвердила її відповідність основним аналітичним критеріям. Методика характеризується достатньою чутливістю, що підтверджується встановленням нижньої межі кількісного визначення на рівні 10 мкг/мл за співвідношення сигнал/шум 12,6. Методика є прецизійною та відтворюваною, оскільки значення відносного стандартного відхилення під час оцінювання повторюваності та внутрішньолaboratorної прецизійності

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

Серія	Розчин	Уведено в модельну суміш (щодо концентрації в розчині порівняння), %	Знайдено в модельній суміші (на основі результатів піків щодо концентрації в розчині порівняння), %	Концентрація АФІ щодо 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 усіма концентраціями)				100,26	0,85

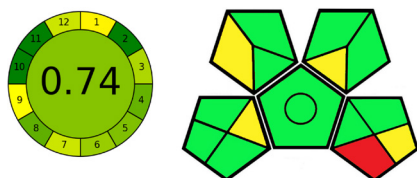


Рис. 4. Індикатори «зеленості» валідованої методики за методами Analytical GREENness Metric (AGREE) та Green Analytical Procedure Index (GAPI)

не перевищували 2 %. Встановлено високу лінійність у робочому діапазоні 80–120 % від номінального вмісту АФІ ($R^2 = 0,9981$), а також правильність визначення, що підтверджується середнім відсотком вилучення 100,26 % за RSD 0,85 %.

Комплексне оцінювання екологічного профілю розробленої методики з позицій «зеленої» аналітичної хімії за індексами AGREE

та GAPI показало, що метод характеризується помірним і прийнятним екологічним навантаженням (AGREE = 0,74), а основні потенційно несприятливі чинники обмежуються використанням ацетонітрилу й енергоспоживанням ВЕРХ-системи.

ВНЕСОК КОЖНОГО З АВТОРІВ: Усенко Д. Л. – здійснено експериментальне дослідження, аналіз та інтерпретацію даних дослідження, обговорення результатів і підготовка оригінального тексту статті; Каплаушенко А. Г. – курація, розроблення концепції та дизайну дослідження; Нечипоренко В. Т. – написання, редагування та остаточне затвердження статті; Ігнатова Т. В. – написання, редагування та остаточне затвердження статті.

ІНФОРМАЦІЯ ЩОДО КОНФЛІКТУ ІНТЕРЕСІВ: конфлікт інтересів відсутній.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dovbnia D., Frolova Yu., Kaplaushenko A. A study of hypoglycemic activity of acids and salts containing 1,2,4-triazole. *Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti*. 2023. Vol. 72. Is. 3. P. 113–124.
2. Usenko D., Varynskyi B., Kaplaushenko A. 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*. 2023. Vol. 35. Is. 2. P. 32–41.
3. Ihnatova T., Kaplaushenko A., Frolova Yu., Pryho E.. Synthesis and antioxidant properties of some new 5-phenethyl-3-thio-1,2,4-triazoles. *Pharmacia*. 2021. Vol. 68 (1). P. 129–133. DOI: <https://doi.org/10.3897/pharmacia.68.e53320>
4. Varynskyi B., Kaplaushenko A. The force degradation study of the morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 2019. Vol. 30 (1). P. 25–34. DOI: <https://doi.org/10.14499/indonesianjpharm30iss1pp25>
5. Varynskyi B., Scherback M., Kaplaushenko A., Yurchenko I. The study of thione-thiol tautomerism of 4-amino-5-(4-nitrophenyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione by HPLC-MS method. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2014. Vol. 6 (5). P. 1342–1350. URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84907093878&origin=resultslist&sort=plf-f>
6. Kaplaushenko A. Synthesis methods and biological activity of 1,2,4-triazol-3-thions. *Ukraine Biofarmatceutical Journal*. 2009. Vol. 1 (4). P. 48–53.
7. Kaplaushenko A. Chemical properties of amino and thio-substituted 1,2,4-triazoles. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2015. Vol. 1. P. 101–106.
8. Gotsulya A. Synthesis and antiradical activity of alkyl derivatives of 5-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol. *J. Fac. Pharm. Ankara*. 2020. Vol. 44 (2). P. 211–219.
9. Shcherbyna R., Parchenko V., Varynskyi B., Kaplaushenko A. The development of HPLC-DAD method for determination of active pharmaceutical ingredient in the potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate substance. *Current issues in pharmacy and medical sciences*. 2019. Vol. 32 (1). P. 5–9.
10. Сафонов А. Синтез, перетворення, фізико-хімічні і біологічні властивості похідних 1,2,4-триазолу, які містять тіофен-2- ілметильний замісник : дис. ... докт. фарм. наук. Запоріжжя, 2023. 426 с. URL: <https://mphu.edu.ua/upload/updisert/d1760003/16830164012.pdf>
11. Державна фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 2. Харків, 2008. 620 с.
12. Державна фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 1. Харків : РІРЕГ, 2004. 520 с.
13. Державна фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 3. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. 280 с.
14. Державна фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 4. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. 540 с.

15. Державна фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид. Т. 1. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. 1128 с.

16. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). 11th Edition. Strasbourg : Council of Europe, 2023.

REFERENCES

1. Dovbnia, D., Frolova, Y., & Kaplaushenko, A. (2023). A study of hypoglycemic activity of acids and salts containing 1,2,4-triazole. *Ceska a Slovenska Farmacie: Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti*, 72 (3), 113–124.

2. Usenko, D., Varynskyi, B., & Kaplaushenko, A. (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.

3. Ihnatova, T., Kaplaushenko, A., Frolova, Y., & Pryhlo, E. (2021). Synthesis and antioxidant properties of some new 5-phenethyl-3-thio-1,2,4-triazoles. *Pharmacia*, 68 (1), 129–133. DOI: <https://doi.org/10.3897/pharmacia.68.e53320>.

4. Varynskyi, B., & Kaplaushenko, A. (2019). The forced degradation study of the morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 30 (1), 25–34. DOI: <https://doi.org/10.14499/indonesianjpharm30iss1pp25>

5. Varynskyi, B. A., Scherback, M. A., Kaplaushenko, A. G., & Yurchenko, I. A. (2014). The study of thione–thiol tautomerism of 4-amino-5-(4-nitrophenyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione by HPLC-MS method. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(5), 1342–1350.

6. Kaplaushenko, A. H. (2009). Synthesis methods and biological activity of 1,2,4-triazol-3-thiones. *Ukrainian Biopharmaceutical Journal*, 1 (4), 48–53.

7. Kaplaushenko, A.H. (2015). Chemical properties of amino- and thio-substituted 1,2,4-triazoles. *Current Issues in Pharmacy and Medicine: Science and Practice*, (1), 101–106.

8. Gotsulya, A. S. (2020). Synthesis and antiradical activity of alkyl derivatives of 5-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiol. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44 (2), 211–219.

9. Shcherbyna, R., Parchenko, V., Varynskyi, B., & Kaplaushenko, A. (2019). The development of

17. Usenko D., Safoinov A., Varinskyi B., Kaplaushenko A. 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*. 2023. URL: <https://base.nipo.gov.ua/searchbulletin/search.php?action=viewdetails&dbname=invc&IdClaim=286029>

HPLC-DAD method for determination of active pharmaceutical ingredient in the potassium 2-((4-amino-5-(morpholinomethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate substance. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 32 (1), 5–9.

10. Safonov, A. A. (2023). Synthesis, transformations, physicochemical and biological properties of 1,2,4-triazole derivatives containing thiophen-2-ylmethyl substituent (Doctoral dissertation, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University). Retrieved from: <https://mphu.edu.ua/upload/updisert/d1760003/16830164012.pdf>

11. State Enterprise “Scientific and Expert Pharmacopoeial Centre”. (2008). *State Pharmacopoeia of Ukraine* (1st ed., Supplement 2). Kharkiv.

12. State Enterprise “Scientific and Expert Pharmacopoeial Centre”. (2004). *State Pharmacopoeia of Ukraine* (1st ed., Supplement 1). Kharkiv : RIREG.

13. State Enterprise “Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Centre for Quality of Medicines”. (2009). *State Pharmacopoeia of Ukraine* (1st ed., Supplement 3). Kharkiv.

14. State Enterprise “Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Centre for Quality of Medicines”. (2011). *State Pharmacopoeia of Ukraine* (1st ed., Supplement 4). Kharkiv.

15. State Enterprise “Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Centre for Quality of Medicines”. (2015). *State Pharmacopoeia of Ukraine* (2nd ed., Vol. 1). Kharkiv.

16. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2023). *European Pharmacopoeia* (11th ed.). Strasbourg: Council of Europe.

17. Usenko, D. L., Safonov, A. A., Varynskyi, B. O., & Kaplaushenko, A. H. (2023). Method for quantitative determination of sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (Ukrainian Patent № 127442). Ukrainian Intellectual Property Institute. Retrieved from: <https://base.nipo.gov.ua/searchbulletin/search.php?action=viewdetails&dbname=invc&IdClaim=286029>

Адреса для листування: usenko.d.l@ukr.net

**VALIDATION AND ASSESSMENT OF THE HPLC METHOD PROFILE
FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE API SODIUM
2-((4-AMINO-5-(THIOPHEN-2-YLMETHYL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)THIO)ACETATE**

Summary

Introduction. Derivatives of 1,2,4-triazole occupy an important place among modern biologically active compounds due to their broad spectrum of pharmacological properties. Of particular interest is sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate, a promising active pharmaceutical ingredient with proven actoprotective and stress-protective effects. Its implementation into pharmaceutical practice requires reliable analytical methods for quality control.

The Aim of the Study. To validate a rapid, accurate, and environmentally justified HPLC method for the quantitative determination of sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in the substance.

Research Methods. The study was performed using high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC–DAD) on an Agilent 1260 Infinity system. Analysis was carried out under isocratic conditions on a Zorbax SB-C18 column using a water–acetonitrile mobile phase with the addition of 0,1 % formic acid. Method validation was conducted in accordance with ICH Q2(R1), the State Pharmacopoeia of Ukraine, and the European Pharmacopoeia, including evaluation of sensitivity, linearity, precision, accuracy, and environmental profile (AGREE, GAPI).

Results and Discussion. The lower limit of quantification was established at 10 µg/mL with a signal-to-noise ratio of 12,6. The method demonstrated high linearity in the range of 80–120 % of the nominal concentration ($RI = 0,9981$), satisfactory precision ($RSD \leq 2 \%$), and accuracy (mean recovery 100,26 %). Assessment based on the principles of green analytical chemistry indicated an acceptable environmental profile of the developed method ($AGREE = 0,74$).

Conclusions. The developed and validated HPLC method is rapid, sensitive, accurate, reproducible, and environmentally justified. It can be recommended for quality control of the substance sodium 2-((4-amino-5-(thiophen-2-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate and for use during pharmaceutical development and standardization of promising medicinal products based on this API.

KEY WORDS: 1,2,4-triazole; API; HPLC; validation; quantitative determination; substance; green analytical chemistry.

Стаття надійшла до редакції 16.11.2025
Стаття прийнята 09.12.2025
Статтю опубліковано 31.12.2025

