

УДК 543.544

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ 5-МЕТИЛ-6-НИТРО-7-ОКСО-1,2,4-ТРИАЗОЛО[1,5-*a*]ПИРИМИДИНИДА *l*-АРГИНИНИЯ МОНОГИДРАТА – ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «ТРИАЗИД» – МЕТОДОМ ВЭЖХ

А.В. Баклыков¹, А.А. Тумашов^{1,2}, С.К. Котовская^{1,2}, Е.Н. Уломский^{1,2},
Г.Л. Русинов^{1,2}, В.Л. Русинов^{1,2}, Г.А. Артемьев¹, Д.С. Копчук^{1,2*},
В.Н. Чарушин^{1,2}

Резюме. Разработана методика количественного определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *l*-аргининия методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Для достижения наилучших хроматографических характеристик предложено использовать колонку с привитой обращенной октадецилсилановой фазой 100-5-с18 (ЕКА, Швеция). Возможность применения разработанной методики для осуществления контроля готовой субстанции препарата «Триазид» установлена по итогам проведения валидации.

Ключевые слова: 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид *l*-аргининия, «Триазид», ВЭЖХ, валидация.

METHOD OF DETERMINATION OF 5-METHYL-6-NITRO-7-OXO-1,2,4-TRIAZOLO[1,5-*a*]PIRIMIDINIDE *l*-ARGININY – THE ACTIVE COMPONENT OF DRUG «TRIAZID» BY HPLC METHOD

A.V. Baklykov¹, A.A. Tumashov^{1,2}, S.K. Kotovskaya^{1,2}, E.N. Ulomsky^{1,2}, G.L. Rusinov^{1,2}, V.L. Rusinov^{1,2}, G.A. Artem'ev¹, D.S. Kopychuk^{1,2*}, V.N. Charushin^{1,2}

Abstract. A procedure for quantitative determination of 5-methyl-6-nitro-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidinide *l*-argininy was developed using the HPLC method with UV detection. To achieve the best chromatographic characteristics, it is proposed to use a column with a grafted octadecylsilyl phase 5-100-с18 (EKA, Sweden). The possibility of applying the developed procedure for the technological control of the third stage of the drug «Triazid» preparation was proved by the validation.

Keywords: 5-methyl-6-nitro-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidinide *l*-argininy, triazide, HPLC, validation.

1 – Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 620990, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской/Академическая, д. 22/20

2 – ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620002, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

1 – I.Ya. Postovsky Institute of organic synthesis UB of RAS, 22/20, S. Kovalevskoy/Akademicheskaya str., Yekaterinburg, 620990, Russia

2 – Ural Federal University named after the first president of Russia B.N. Yeltsin, 19, Mira str., Yekaterinburg, 620002, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: dkopchuk@mail.ru

Тел.: 8 (982) 643 07 77

ВВЕДЕНИЕ

Острые респираторные вирусные инфекции, в частности грипп, в настоящее время занимают ведущее место в этиологической структуре общей заболеваемости населения. С учетом современной эпидемической ситуации, характеризующейся одновременной циркуляцией двух типов вируса гриппа А и В, а также появлением новых эпидемических вариантов вируса гриппа, важное значение приобретает поиск новых противовирусных препаратов [1, 2].

К настоящему времени в результате совместных исследований Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Уральского федерального университета им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, НИИ гриппа Минздрава России и ПАО «Отисифарм» разработан оригинальный противовирусный препарат «Триазид» (5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *l*-аргининия, моногидрат **1**), для которого в настоящее время проводятся клинические испытания [3]. Следует отметить, что при создании лекарственного средства важной со-

ставляющей, наряду с эффективностью и безопасностью, является технологичность его производства [4].

Процесс получения препарата «Триазид» включает три химические стадии, которые представлены на схеме 1.

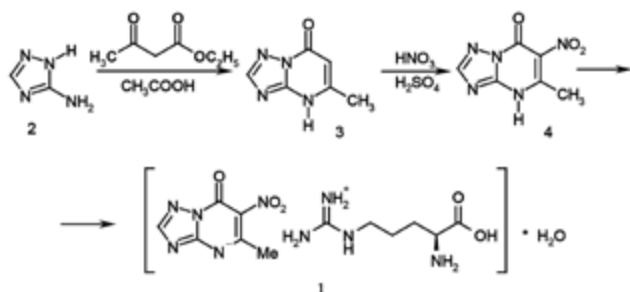


Схема 1

При организации производства любого лекарственного препарата, а также наработке его опытных партий для различных целей очевидной является необходимость аналитического контроля качества как собственно продукта, так и полупродуктов его синтеза. Ранее нами были предложены методики совместного определения методом ВЭЖХ аминотриазола (2) и триазолопиримидинона (3) (аналитический контроль первой стадии производства) [5], а также совместного определения аминотриазола (2), триазолопиримидинона (3) и нитротриазолопиримидинона (4) (аналитический контроль второй стадии производства) [6]. В продолжение этих работ нами выполнены разработка и валидация аналитической методики определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина *l*-аргининия моногидрата (1) методом ВЭЖХ, т.е. обеспечена возможность контроля качества продукта 1, получаемого в рамках последней стадии синтеза субстанции препарата «Триазид». Целесообразность проведения полной оценки метрологических характеристик обусловлена дальнейшим применением разработанной методики при осуществлении контроля опытно-промышленного и промышленного производства препарата «Триазид».

Поскольку данный противовирусный препарат является новым, то очевидно, что в литературе ранее не было описано ни одного метода его количественного определения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали жидкостной хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором и автосамплером, снабженный колонкой с привитой обращенной октадецилсилановой фазой 100-5-с18 (ЕКА, Швеция) длиной 250 мм, внутренним диаметром – 4,6 мм, размер частиц сор-



Жидкостный хроматограф Agilent Technologies Infinity II 1290

бента – 5 мкм. Температура колонки – 25 °С. Режим элюирования – изократический. Скорость потока – 0,9 мл/мин. Детектирование осуществляли при 360 нм. Объем вводимой пробы – 30 мкл.

В качестве элюента использовали ацетонитрил (HPLC-grade, Sigma-Aldrich, кат. № i10001, США) и буферный раствор 0,04 М *L*-аргинина ацетата в соотношении 8:92. *L*-аргинина ацетат был синтезирован по описанной методике [7].

Субстанция препарата «Триазид» была синтезирована в Уральском федеральном университете им. первого Президента России Б.Н. Ельцина. Образцы готового препарата и полупродуктов были получены в технологической лаборатории Института органического синтеза им. И.Я. Пастовского УрО РАН.

Приготовление буферного раствора. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 9,36 г *L*-аргинина ацетата, добавляют 700 мл воды для ВЭЖХ и перемешивают полученную смесь до полного растворения. Доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

Приготовление подвижной фазы. 920 мл буферного раствора помещают в мерную колбу вместимостью

1000 мл, доводят объём раствора ацетонитрилом до метки и перемешивают. Полученный раствор перед применением фильтруют через тefлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм на установке для фильтрации и дегазации растворителей, оснащённой мембранным вакуумным насосом, и дегазируют.

Испытуемый раствор и раствор СО субстанции. Навеску 25 мг препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 20 мл подвижной фазы, перемешивают в ультразвуковой бане в течение 1 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят подвижной фазой до метки и перемешивают.

Все используемые субстанции растворяют в элюенте.

Количественное определение. Хроматографируют приготовленные раствор СО субстанции препарата «Триазид» и испытуемый раствор. Содержание $C_{12}H_{19}N_9O_5 \cdot H_2O$ в пересчете на безводное вещество в субстанции в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times a_0 \times 25 \times P \times 100}{S_0 \times a_1 \times 25 \times (100 - W)} = \frac{S_1 \times a_0 \times P \times 100}{S_0 \times a_1 \times (100 - W)},$$

где S_1 – среднее значение площади пика триазида на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – среднее значение площади пика триазида на хроматограмме раствора СО субстанции препарата «Триазид»; a_0 – навеска СО субстанции препарата «Триазид», г; a_1 – навеска субстанции, г; P – содержание основного вещества в СО субстанции препарата «Триазид», %; W – потеря в массе при высушивании.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Триазид – производное 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина и аминокислоты L-аргинина – является соединением с ионной химической связью (рисунок 1).

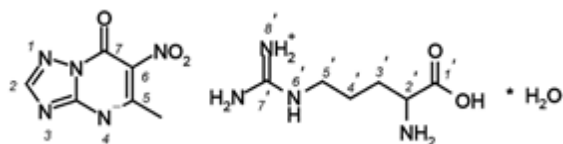


Рисунок 1. Структура триазида

Известно, что аргинин является сильноосновным соединением со значением pK_a 12,48, тогда как нитротриазолопиримидин представляет собой NH-кислоту средней силы (pK_a около 2,8). Для *Триазида* значение pK_a составило 9,8 (определение значений pK_a было выполнено согласно [8]).

В соответствии со схемой синтеза препарата «Триазид» (схема 2) наиболее очевидными примесями конечного продукта являются 3-амино-1,2,4-триазол

(2), 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-он (3) и 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-он (4). Также возможной является примесь 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидината $8H^+$ -аргининия (5) в результате получения соли с L-аргинином на основе 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она (3) (схема 3).

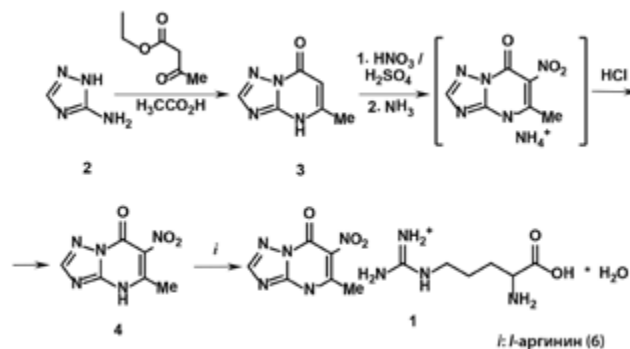


Схема 2

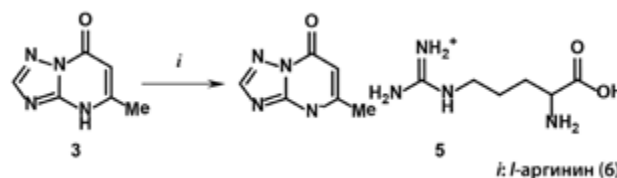


Схема 3

Выполненные хроматографические исследования всех ранее синтезированных партий препарата «Триазид» не выявили ни в одном случае присутствия примеси 3-амино-1,2,4-триазола (2) на уровне предела обнаружения, поэтому он исключается из дальнейшего рассмотрения в качестве возможной примеси.

Что касается 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она (4), то рассматривать его в качестве примеси в препарате «Триазид», на наш взгляд, также представляется нецелесообразным. Это соединение в водных растворах находится в равновесном состоянии с *триазидом*, и его количество будет зависеть от pH среды.

В процессе поиска и оптимизации условий проведения методики ВЭЖХ-анализа в качестве буферных растворов были опробованы ацетат аммония и ацетат аргинина. При использовании ацетата аммония существует возможность появления других примесей в результате ионообмена между молекулами буфера и *триазида* (1), в результате чего может иметь место образование солей: ацетата аргинина (7), 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидината аммония (8) и 5-метил-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидината аммония (9) (схемы 4 и 5). По итогам

анализов нами было установлено наличие ацетата аргинина (7). Таким образом, для предотвращения ионообменных процессов и появления в результате этого дополнительных примесей при хроматографировании было решено заменить 0,05 М буферный раствор ацетата аммония в подвижной фазе на 0,04 М раствор ацетата аргинина. При использовании ацетата аргинина в качестве буферного раствора в подвижной фазе не были зарегистрированы пики, соответствующие нежелательным примесям соединений 7-9.

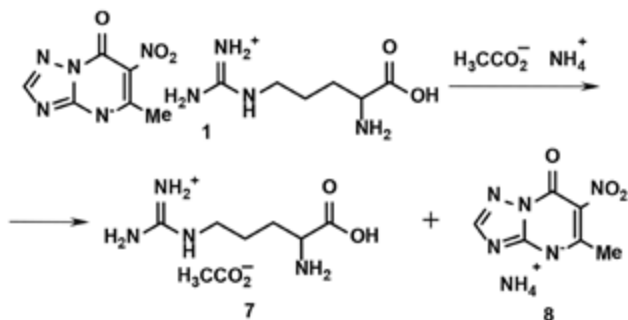


Схема 4

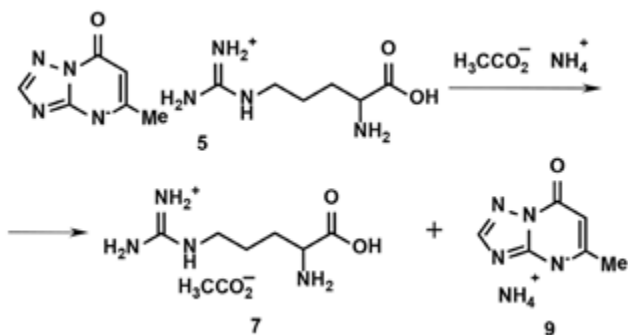


Схема 5

Для оптимизации условий проведения ВЭЖХ-анализа нами также варьировался такой параметр, как длина волны детектирования. Первоначально детектирование проводилось с использованием значения 220 нм. В этом случае при регистрации хроматограмм достигается высокая интенсивность пика, соответствующего *триазиду*, для которого характерно высокое поглощение при данной длине волны. Однако ацетат аргинина и ацетат аммония также имеют достаточно интенсивное поглощение в этой области, в связи с чем было решено использовать более длинноволновую область УФ-спектра (рисунок 2).

Процедуру валидации разработанной методики осуществляли по следующим параметрам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность [9].

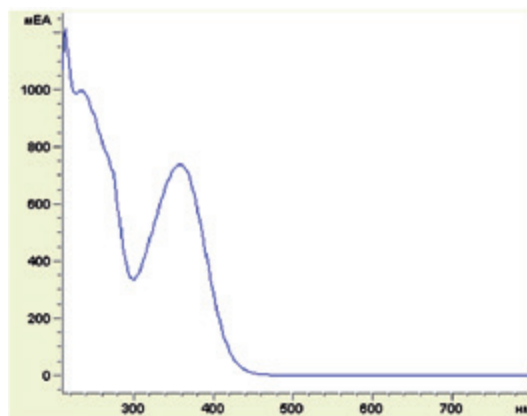


Рисунок 2. Спектр поглощения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид *l*-аргининия моногидрата (1) в используемом элюенте

Аналитическая область методики – от 80 до 120% по содержанию 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид *l*-аргининия моногидрата (1) в субстанции.

Специфичность представляет собой способность достоверно определять анализируемое вещество в присутствии других компонентов и возможных примесей. Для подтверждения специфичности методики получены хроматограммы следующих растворов: 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид *l*-аргининия моногидрата (1) (основного вещества) (рисунок 3) и матрицы (рисунок 4). Время удерживания пика основного вещества (1) составило около 8,5 мин. На хроматограмме матрицы отсутствуют пики, препятствующие определению основного вещества, что свидетельствует о возможности применения данной методики для определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид *l*-аргининия моногидрата (1).

Линейность методики характеризуется наличием линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

Для оценки линейности использовали стандартные растворы 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид *l*-аргининия моногидрата (1) с номинальными концентрациями от 0,8 до 1,2 мг/мл. Установлено, что графики зависимости имеют линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций и описываются уравнением $y=4260,8x-57,5$ (рисунок 5, таблица 1), коэффициент корреляции при этом близок к единице – 0,99998.

Правильность характеризует близость результатов, получаемых с помощью данной методики, к истинному значению. Правильность методики устанавлива-

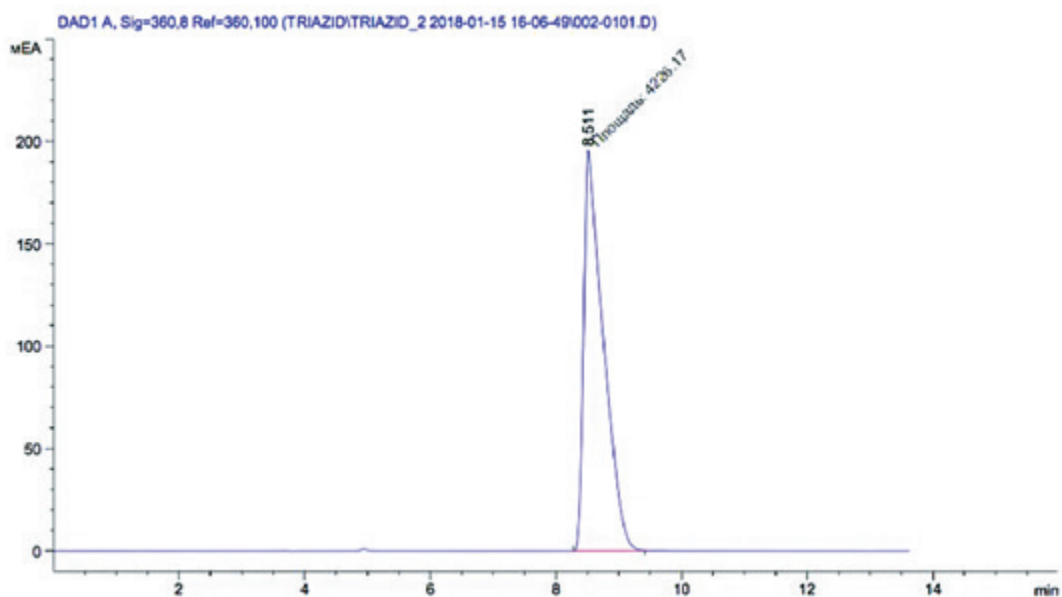


Рисунок 3. Хроматограмма 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида *l*-аргининия моногидрата (1), 360 нм

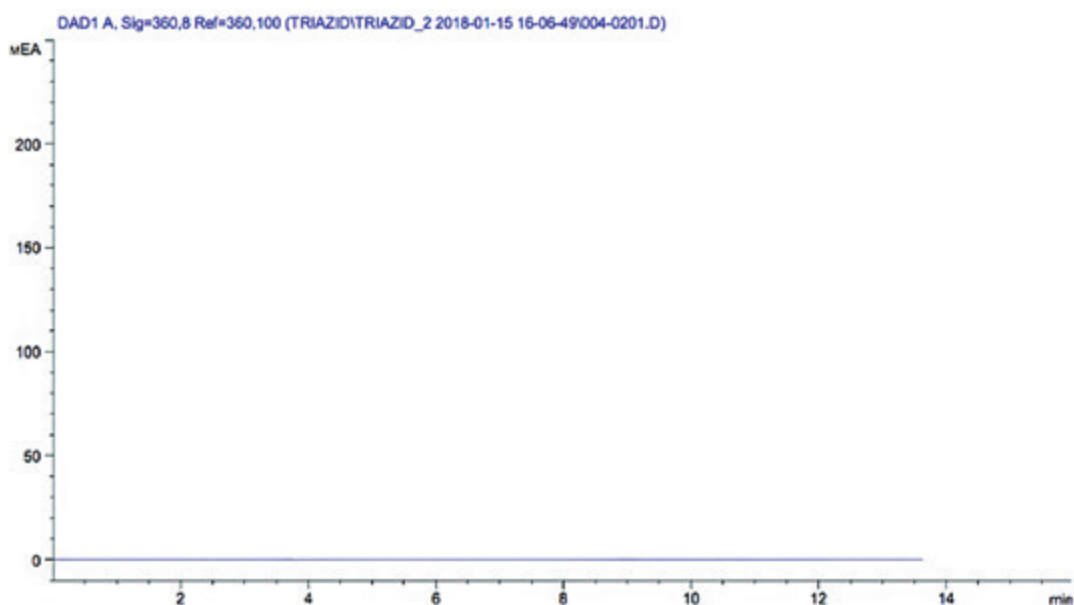


Рисунок 4. Хроматограмма матрицы анализируемого вещества, 360 нм

ли по результатам анализа методом добавок (таблица 2). Для полученных значений концентраций были рассчитаны: процент восстановления, среднее квадратичное отклонение (СКО, %) и коэффициент вариации. Полученные величины среднее квадратичного отклонения (СКО, %) и относительного отклонения результата не превышают 3%.

Предел количественного определения данной методики по 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида *l*-аргининия моногид-

рату (1) составил 0,45 мг/мл, а предел детектирования – 0,135 мг/мл.

Сходимость характеризует степень согласованности результатов измерений (испытаний), полученных одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Коэффициент вариации параллельных определений для 6 измерений составил менее 1,5%.

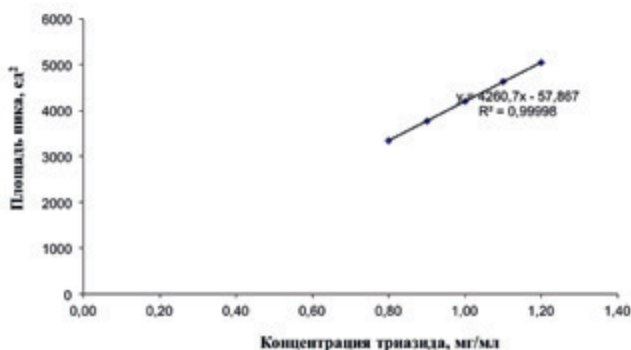


Рисунок 5. График зависимости концентрации от площади пика для 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида l-аргининия моногидрата (1)

Таблица 1.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида l-аргининия моногидрата (1) от площади пика

| Концентрация, мг/мл | Площадь пика, ед ² | | | Среднее значение | СКО, % |
|---------------------|-------------------------------|----------------|----------------|------------------|--------|
| | S ₁ | S ₂ | S ₃ | | |
| 0,80 | 3360 | 3344 | 3343 | 3349,0 | 0,285 |
| 0,90 | 3770 | 3777 | 3781 | 3776,0 | 0,147 |
| 1,00 | 4214 | 4204 | 4205 | 4207,7 | 0,131 |
| 1,10 | 4637 | 4627 | 4620 | 4628,0 | 0,185 |
| 1,20 | 5051 | 5046 | 5063 | 5053,3 | 0,173 |

Таблица 2.

Данные для оценки правильности методики

| Введенное количество в образце, мг/мл | Результат, мг/мл | Процент восстановления, % | Среднее значение результатов, мг/мл | СКО, % | Коэффициент вариации |
|--|------------------|---------------------------|-------------------------------------|--------|----------------------|
| 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида l-аргининия моногидрат (1) | | | | | |
| 0,9000 | 0,9083 | 100,92 | 0,9056 | 0,249 | 0,275 |
| | 0,9033 | 100,37 | | | |
| | 0,9052 | 100,58 | | | |
| 1,0000 | 1,0029 | 100,29 | 1,0025 | 0,213 | 0,212 |
| | 1,0045 | 100,45 | | | |
| | 1,0003 | 100,03 | | | |
| 1,1000 | 1,1087 | 100,79 | 1,1086 | 0,095 | 0,086 |
| | 1,1094 | 100,86 | | | |
| | 1,1075 | 100,68 | | | |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования разработана оптимизированная методика определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]

пиримидинида l-аргининия моногидрата (1) с помощью метода ВЭЖХ. Методика проста в применении, не требует больших временных затрат и дополнительных процедур дериватизации с большим расходом реагентов, обладает высокой чувствительностью и позволяет определять содержание основного вещества в субстанции от 80 до 120%.

Проведена валидация разработанной аналитической методики, по результатам которой показана возможность ее применения для контроля последней стадии технологического процесса получения опытно-промышленных и промышленных партий препарата «Триазад». Данная методика была успешно применена для анализа опытных партий препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. О.И. Киселев. Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. – СПб: Росток, 2012. 272 с.
2. Г.А. Артемьев. Разработка технологии производства субстанции противовирусного препарата «Триазабирин»: дис. ... к.т.н. – Екатеринбург: УрФУ, ИОС УрО РАН, 2017. 157 с.
3. Патент № 2529487 РФ. 5-Метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинид l-аргининия моногидрат / О.Н. Чулахин, В.Н. Чарушин, В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, С.К. Котовская, О.И. Киселев, Э.Г. Деева, К.В. Саватеев, С.С. Борисов. – № 2013116765; заявл. 15.04.13; опубл. 27.09.14.
4. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».
5. А.В. Баклыков, А.А. Тумашов, С.К. Котовская, Е.Н. Уломский, Г.Л. Русинов, В.Л. Русинов, О.Н. Чулахин, В.Н. Чарушин. Методика совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона – субстрата и полупродукта синтеза лекарственного препарата «Триазад» методом ВЭЖХ // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 2(19). С. 44–48.
6. А.В. Баклыков, А.А. Тумашов, С.К. Котовская, Е.Н. Уломский, Г.Л. Русинов, В.Л. Русинов, Д.С. Копчук, О.Н. Чулахин, В.Н. Чарушин. Методика совместного определения аминотриазола, триазолопиримидинона и нитротриазолопиримидинона – субстрата и полупродуктов синтеза лекарственного препарата «Триазад» методом ВЭЖХ // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 4(21). С. 68–72.
7. P. Gnanasekaran, J. Madhavan. Synthesis, Structural, FT-IR and Non-Linear Optical Studies of Pure and Lanthanum Doped L-Arginine Acetate Single Crystals // Asian Journal of Chemistry. 2010. V. 22. № 1. P. 109–114.
8. Л.Г. Егорова, А.Ю. Петров, В.Л. Русинов. NH-кислотность 7-оксо-4,7-дигидропиразоло- и 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов // ХГС. 1984. № 5. С. 697–699.
9. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I. – М.: НЦЭСМП.