

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. Баклыков<sup>1</sup>, А.А. Тумашов<sup>1,2</sup>, С.К. Котовская<sup>1,2</sup>, Е.Н. Уломский<sup>1,2</sup>,  
Г.Л. Русинов<sup>1,2</sup>, В.Л. Русинов<sup>1,2</sup>, Г.А. Артемьев<sup>1</sup>, Д.С. Копчук<sup>1,2\*</sup>,  
В.Н. Чарушин<sup>1,2</sup>

**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. Baklykov<sup>1</sup>, A.A. Tumashov<sup>1,2</sup>, S.K. Kotovskaya<sup>1,2</sup>, E.N. Ulomsky<sup>1,2</sup>, G.L. Rusinov<sup>1,2</sup>, V.L. Rusinov<sup>1,2</sup>, G.A. Artem'ev<sup>1</sup>, D.S. Kopychuk<sup>1,2\*</sup>, V.N. Charushin<sup>1,2</sup>

**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.

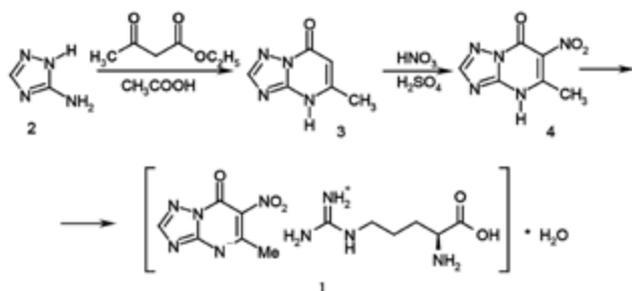


Схема 1

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).

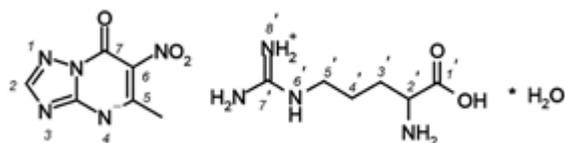


Рисунок 1. Структура триазида

Известно, что аргинин является сильноосновным соединением со значением  $pK_a$  12,48, тогда как нитро-триазолопиримидин 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).

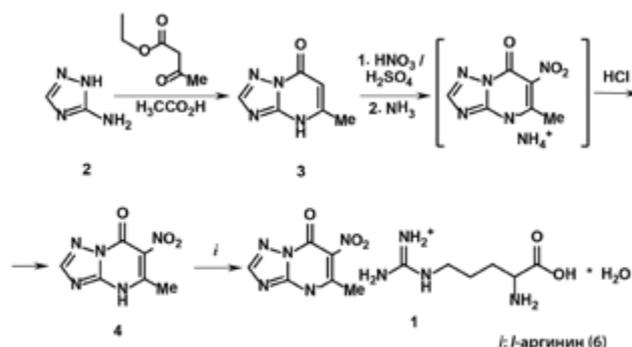


Схема 2

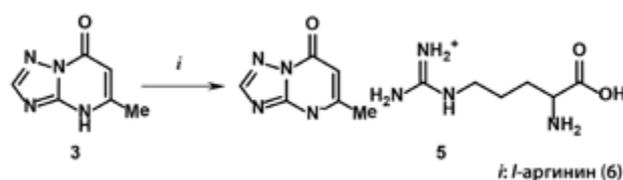


Схема 3

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.

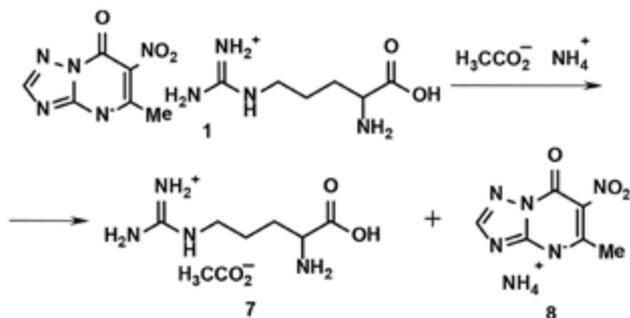


Схема 4

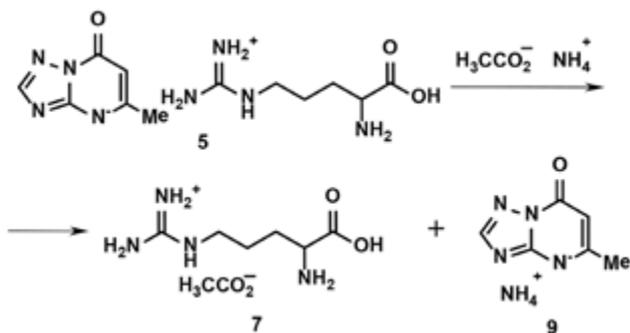


Схема 5

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 *триаиду*, 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].

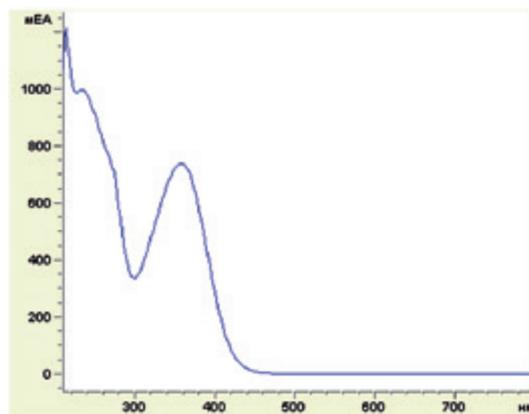


Рисунок 2. Спектр поглощения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинид аргининия моногидрата (1) в используемом элюенте

Аналитическая область методики – от 80 до 120% по содержанию 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинид 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-а]пиримидинид 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-а]пиримидинид 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-а]пиримидинид 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-

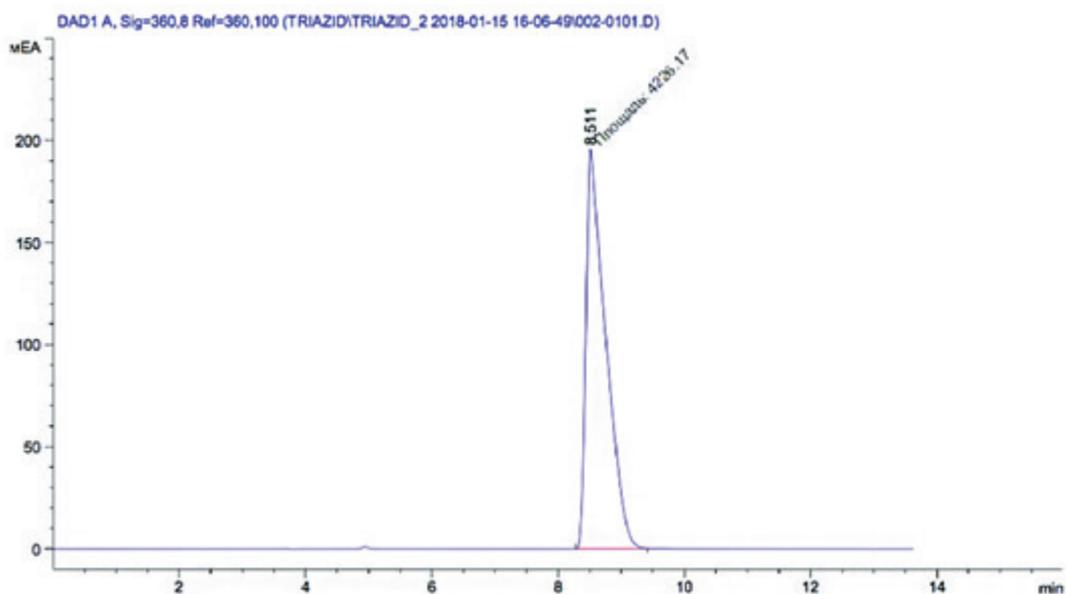


Рисунок 3. Хроматограмма 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида *l*-аргининия моногидрата (1), 360 нм

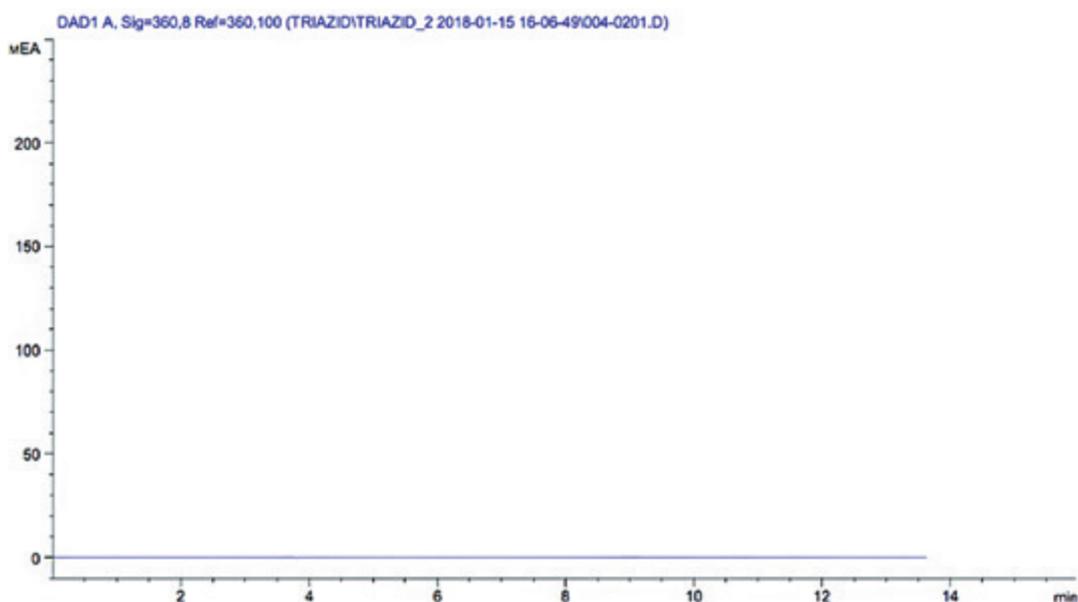


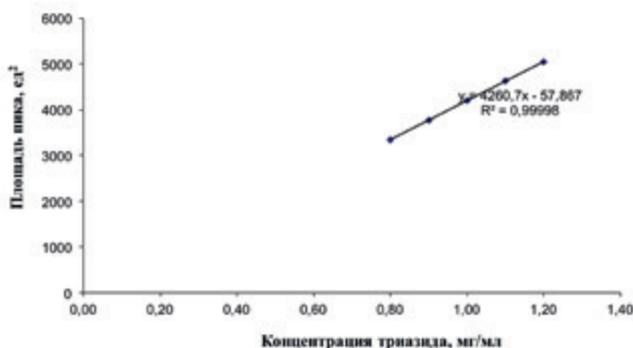
Рисунок 4. Хроматограмма матрицы анализируемого вещества, 360 нм

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]пиримидина 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]пиримидина l-аргининия моногидрата (1) от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед <sup>2</sup>			Среднее значение	СКО, %
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>		
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
<b>5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина l-аргининия моногидрат (1)</b>					
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]

пиримидина 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]пиримидин 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.