

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИАЗАВИРИНА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ НАЗАЛЬНОГО СПРЕЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ВЭЖХ

Кинев М.Ю.<sup>1</sup>, Гаврилин М.В.<sup>2</sup>, Мельникова О.А.<sup>1</sup>, Петров А.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, г.Екатеринбург, Российская Федерация (620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3), e-mail.: mkinev2009@yandex.ru

<sup>2</sup>ООО «Уральский центр биофармацевтических технологий», г.Екатеринбург, Российская Федерация (624130, г. Новоуральск, ул. Нагорная, 11) e-mail: uniitmp@yandex.ru

Разработана методика количественного определения триазавирина с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармацевтической композиции лечебно-профилактического противовирусного действия, содержащей в своем составе триазавирин, морскую соль и воду очищенную. Анализ проведен на жидкостном хроматографе Flexar F 15 (Перкин Элмер) с детектором диодной матрицей. В качестве неподвижной фазы служила хроматографическая колонка «Hydrosphere C18» компании YMC (Япония), 250 мм \* 4,6 мм, размер частиц 3 мкм. Подвижная фаза: 10% ацетонитрила – 90% 0,025М водного раствора натрия уксуснокислого тригидрата, pH = 7,40. Скорость потока 0,85 мл/мин. Детектирование при длине волны 215 нм при определении примеси 3-метилтио-5-амино-1,2,4-триазола. Температура колонки 35±1 °С. Время проведения анализа 20 минут. В результате эксперимента проведен подбор оптимальной подвижной фазы (10% ацетонитрила – 90% 0,025М водного раствора натрия уксуснокислого тригидрата). Проведена валидация разработанной методики по параметрам линейность, прецизионность в условиях повторяемости. Было установлено, что наблюдается линейная зависимость площади пика от концентрации триазавирина в диапазоне концентраций от 10 до 150% от номинального значения, т.е. интервале концентраций от 0,02 до 0,4 мг/мл. Коэффициент корреляции составил 0,9995, что соответствует рекомендуемым значениям (не менее 0,999). Кроме того, было установлено, что методика обладает достаточно хорошей прецизионностью в условиях повторяемости. Относительное стандартное отклонение составило 1,95%.

Ключевые слова: триазавирин, фармацевтическая композиция, ВЭЖХ.

## DEVELOPMENT METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION TRIAZAVIRIN IN PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR NASAL SPRAY USING THE METHOD OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Kinev M.Y.<sup>1</sup>, Gavrilin M.V.<sup>2</sup>, Melnikova O.A.<sup>1</sup> Petrov A.Y.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ural State Medical University, Russian Ministry of Health, Department of Pharmacy, Ykaterinburg, Russian Federation (620028, Ykaterinburg, Repin street, 3), mkinev2009@yandex.ru

<sup>2</sup>Ural Center of Biopharmaceutical Technology, Ekaterinburg, Russian Federation (624130, Novoural'sk city, street. Sermon 11), uniitmp@yandex.ru

The technique of quantitative determination Triazavirin using HPLC in the pharmaceutical composition of therapeutic and prophylactic antiviral action, containing in its composition Triazavirin, sea salt and purified water. The analysis was performed on a liquid chromatograph Flexar F 15 (Perkin Elmer) with a diode array detector. As a stationary phase chromatographic column served «Hydrosphere C18» company YMC (Japan), 250 mm \* 4.6 mm, 3 micron particle size. Mobile phase: 10% acetonitrile - 90% 0.025M aqueous sodium acetate solution, pH = 7.40. The flow rate of 0.85 ml / min. Detection at 215 nm when determining impurities 3-methylthio-5-amino-1,2,4-triazole. Column temperature 35 ± 1 0C. Analysis time of 20 minutes. The experiment carried out the selection of the optimum mobile phase (10% acetonitrile - 90% 0.025M aqueous solution of sodium acetate). Conducted validation of the developed technique in the parameters linearity, precision under repeatability conditions. It has been found that there is a linear dependence on the concentration of the peak area Triazavirin at concentrations ranging from 10 to 150% of the nominal value, i.e. concentrations ranging from 0,02 to 0,4 mg / ml. The correlation coefficient was 0.9995, which corresponds to the recommended values (not less than 0.999). Furthermore, it was found that the method has a sufficiently good precision in terms of repeatability. The relative standard deviation was 1,95%.

Keywords: Triazavirin., pharmaceutical composition, high performance liquid chromatography.

Назальные спреи, содержащие в своем составе морскую соль (морскую воду) находят широкое применение в отоларингологической практике, так как способствуют поддержанию физиологического состояния слизистой оболочки полости носа. Соли, находящиеся в морской воде, способствуют разжижению слизи, а также нормализуют ее выработку клетками слизистой носа. Входящие в состав морской соли микроэлементы улучшают функцию реснитчатых клеток мерцательного эпителия, что приводит к повышению резистентности слизистой полости носа к внедрению болезнетворных бактерий и вирусов, приводит к хорошему очищению последней от загрязняющих примесей [4]. Введение в состав морской воды (морской соли) противовирусного лекарственного средства (триазамирин) позволило создать новую оригинальную фармацевтическую композицию, которая будет оказывать противовирусный, антибактериальный и противовоспалительный эффекты. Известно, что Триазамирин – это новый противовирусный лекарственный препарат для лечения гриппа, впервые был синтезирован в ИОС УРО РАН (г.Екатеринбург) совместно с УГТУ-УПИ (г.Екатеринбург), клинические исследования проводились в ФГБУ НИИ гриппа (г. Санкт-Петербург) [1,2]. Для количественного определения триазамирин в фармацевтических субстанциях и готовых лекарственных формах необходимы надежные и достоверные методы и методики анализа. Таким методом является ВЭЖХ. В настоящее время разработана методика количественного определения триазамирин в фармацевтической субстанции [3], в капсулах и таблетках [2], однако, отсутствует методика количественного определения триазамирин в фармацевтических композициях для назального применения, поэтому целью данной работы была ее разработка.

#### **Материалы и методы исследования**

В работе использовалась фармацевтическая субстанция триазамирин (ООО "Завод Медсинтез", Россия, соответствующая ФС 000279-141211), стандартный образец фармацевтической субстанции триазамирин (ООО "Завод Медсинтез", Россия, соответствующий требованиям ФС Триазамирин стандартный образец), морская соль («Биотек Марин», Франция: СТП 00480201-363-2012,), вода очищенная.

Количественное определение триазамирин в фармацевтической композиции проводилось с использованием метода ВЭЖХ. Анализ выполнялся на жидкостном хроматографе Flexar F 15 (Перкин Элмер) с УФ детектором. В качестве неподвижной фазы служила хроматографическая колонка «Hydrosphere C18» компании YMC (Япония), 250 мм × 4,6 мм, размер частиц 3 мкм. Подвижная фаза: 10% ацетонитрила – 90% 0,025М водного раствора натрия ацетата тригидрата, pH = 7,40. Скорость потока 0,85 мл/мин. Детектирование осуществляли при длине волны 215 нм. Температура колонки 35±1 °С. Время проведения анализа 20 минут.

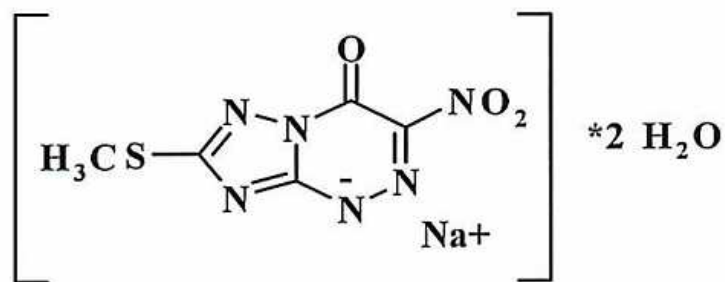
*Методика.* Исследуемый раствор: 2,5 мл исследуемого раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, обрабатывали смесью ацетонитрил - 0,025М водного раствора натрия ацетата тригидрата (10:90), перемешивали в течение 10 минут, доводили до метки подвижной фазой.

Точную навеску стандартного образца триазавирина около 25 мг высушенного до постоянной массы, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в растворе подвижной фазы, перемешивали и доводили до метки растворителем.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Для проведения исследования по количественному определению триазавирина была приготовлена модельная смесь состава: триазавирина 0,2508 г., морская соль 0,2506 г., вода очищенная до 25 мл.

На первом этапе исследования с целью разработки методики количественного определения представляло интерес подобрать оптимальную подвижную фазу (элюент) и условия хроматографирования. При подборе подвижной фазы учитывалась растворимость триазавирина в органических растворителях. Было установлено, что фармацевтическая субстанция триазавирина растворима диметилсульфоксиде, диметилформамиде, ацетонитриле и других органических растворителях. Наличие разнообразных групп (нитрогруппы, азогруппы, метилтиогруппы) в химической структуре триазавирина (рис.1) делает возможным применение метода ВЭЖХ в количественном анализе.



**Рис. 1.** Химическая структура триазавирина

В результате анализа литературных источников [5] было установлено, что наиболее часто в методе ВЭЖХ в качестве подвижной фазы используется ацетонитрил. Данный элюент находит широкое применение при анализе лекарственных препаратов. Кроме того, ацетонитрил обладает достаточно высокой элюирующей силой, относительно незначительным токсическим действием, низкой вязкостью и доступностью. Было установлено, что триазавирина растворим в ацетонитриле. Также было установлено, что наиболее часто при анализе лекарственных препаратов, являющихся солями сильных оснований, используется сочетание ацетонитрила с 0,025М водным раствором натрия ацетата. Поэтому выбор был сделан в пользу данной подвижной фазы. Следующим этапом

был подбор оптимального соотношения ацетонитрила и 0,025М водного раствора натрия ацетата тригидрата. С этой целью были приготовлены растворы, содержащие различное соотношение ацетонитрила и 0,025М водного раствора натрия ацетата тригидрата (табл. 1).

Таблица 1

**Соотношение компонентов в составе подвижной фазы**

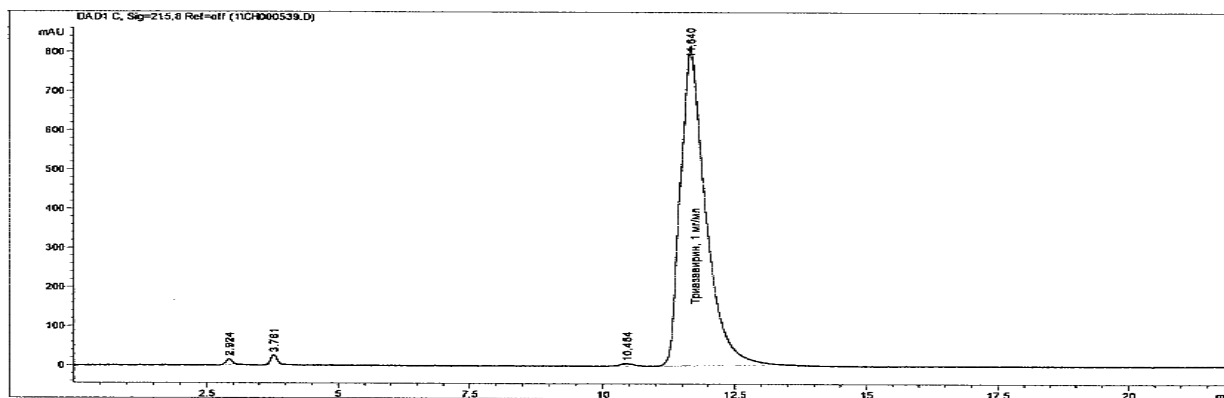
№ подвижн ой фазы	Компоненты подвижной фазы	
	Ацетонитрил, %	0,025М водного раствора натрия ацетата тригидрата, %
1	5	95
2	10	90
3	15	85
4	20	80
5	25	75
6	30	70

Было установлено, что наиболее оптимальное время хроматографирования, значения эффективности и разрешения между пиками триазавирин и его основной примеси 3-метилтио--5-амино-1,2,4-триазола получались при соотношении ацетонитрила и 0,025М водного раствора натрия ацетата тригидрата (10:90), поэтому был сделан выбор в пользу данного соотношения этих компонентов подвижной фазы.

На следующем этапе была разработана оптимальная методика количественного определения триазавирин в фармацевтической композиции. Методика приготовления исследуемого и стандартного растворов для хроматографирования представлена в разделе «Материалы и методы исследования».

Для анализа 10 мкл испытуемого раствора и 10 мкл раствора стандартного образца субстанции триазавирин попеременно вводили в колонку хроматографа при помощи автосамплера.

На рисунке 2 представлена хроматограмма исследуемого раствора.



**Рис. 2.** Хроматограмма исследуемого раствора

Из представленной на рис. 2 хроматограммы видно, что время удерживания триазавирина при анализе исследуемой модельной смеси составило  $11,0 \pm 0,5$  минут, для стандартного образца триазавирина время удерживания составило  $11,1 \pm 0,5$  минут. Время удерживания исследуемого вещества, находящегося в испытуемом растворе, не значительно отличается от времени удерживания стандартного образца триазавирина. Относительное стандартное отклонение времени удерживания не превышает 0,5%.

Содержание триазавирина в мг в 1 мл исследуемого раствора вычисляли по формуле:

$$X_{\text{мг/мл}} = \frac{S_i \times a_0 \times 25 \times P}{S_0 \times 25 \times 2,5 \times 100}, \text{ где}$$

$S_1$  – среднее значение площади пика триазавирина на хроматограмме испытуемого раствора, полученное из трех определений;

$S_0$  – среднее значение площади пика триазавирина на хроматограмме раствора стандартного образца, полученное из трех определений;

$a_0$  – навеска стандартного образца субстанции триазавирина, мг;

$P$  – содержание триазавирина в стандартном образце, %;

2,5; 25; и 25 показатели разведения;

Проверку пригодности хроматографической колонки проводили по следующей методике: 25 мг (точная навеска) СО триазавирина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл., растворяли в растворе подвижной фазы, добавляли 0,25 мл раствора стандартного образца 3 метилтио-5-амино-1,2,4-триазола, перемешивали и доводили до метки растворителем.

*Приготовление стандартного образца 3 метилтио-5-амино-1,2,4-триазола:* 25 мг (точная навеска) 3 метилтио-5-амино-1,2,4-триазола помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл., растворяли в растворе подвижной фазы, доводили до метки тем же растворителем.

С целью проверки пригодности хроматографической системы проводили 5 кратное хроматографирование 10 мкл раствора. В дальнейшем рассчитывали следующие показатели: эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии. В результате расчетов были получены следующие данные (таблица 2).

### Результаты определения пригодности хроматографической колонки

Наименование параметра хроматографической колонки	Формула расчета	Полученные значения параметра	Нормативный показатель для включения в нормативную документацию
Эффективность колонки для пика триазавирина	$N = 5,54 \times RT^2 / W_{0,5}^2$ , где: RT – время удержания пика; $W_{0,5}$ – ширина пика на 0,5 высоты	3524	Не менее 3500 теоретических тарелок
Разрешение между пиками триазавирина и 3 метилтио-5-амино-1,2,4-триазола	$R_s = (2 \times (t'_{R2} - t'_{R1})) / (W_2 + W_1)$ , где $t'_{R1}$ , $t'_{R2}$ – приведенные времена удерживания образцовых компонентов*; $W_1$ , $W_2$ – ширина пиков образцовых при основании	5,12	Не менее 5
Фактор асимметрии триазавирина на высоте 5% от основания	$T = W_{0,05} / 2a$ , где $W_{0,05}$ – ширина пика на высоте 5%; $a$ – расстояние от фронта пика до высоты, измеренное на высоте 5% от основания	1,3	Не более 1,5

\*время удерживания триазавирина составило 11,640 минут, время удерживания 3 метилтио-5-амино-1,2,4-триазола составило 0,46 минут

Результаты, полученные при хроматографировании, позволяют оценить пригодность данной хроматографической системы, а также сделать заключение о том, что данная система может быть использована для анализа триазавирина в составе фармацевтической композиции для назального применения.

Следующим этапом исследования была валидация методики количественного определения триазавирина в фармацевтической композиции.

Валидация представляет собой процесс экспериментального подтверждения того, что методика, используемая для анализа, обеспечивает получение необходимой и достоверной информации об исследуемом веществе, а также может быть пригодна для практического применения [6].

Валидация методики осуществлялась по таким валидационным характеристикам как линейность, прецизионность в условиях повторяемости и базировалась на данных литературных источников [5,6].

Линейность аналитической методики, по данным литературных источников [6], представляет собой наличие линейной зависимости аналитического сигнала (в нашем случае площадь пика триазавирина) от концентрации определяемого вещества в исследуемой пробе в пределах аналитической области методики.

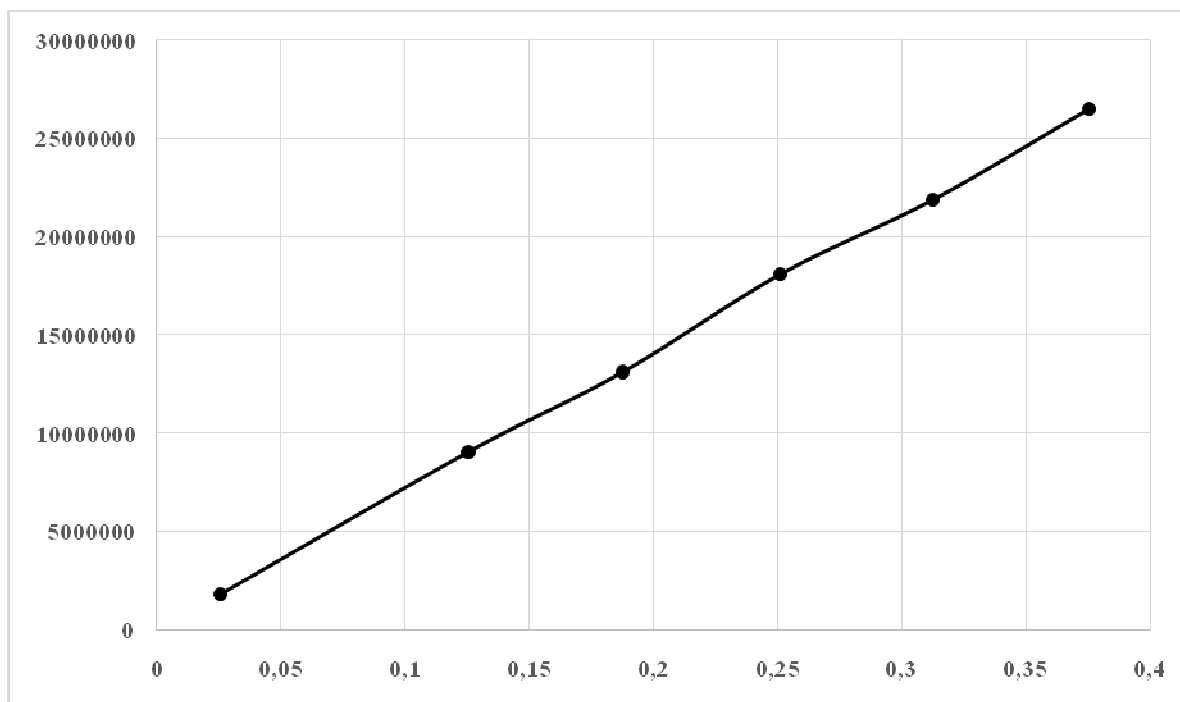
С целью проведения валидации методики по характеристике линейности готовили растворы стандартных веществ из фармацевтической субстанции триазавирина 5 уровней концентрации 10, 50, 75, 100, 125 и 150% от номинального значения с постоянным содержанием в них морской соли (10 мг/мл). Затем проводили разведение, согласно описанной выше методики и хроматографировали полученные пробы. Далее проводили измерение аналитического сигнала, в качестве которого выступала площадь пика для анализируемых проб. Оценку линейности проводили путем расчета коэффициента корреляции (значение должно быть не менее 0,999). Результаты анализа представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Результаты определения триазавирина в фармацевтической композиции (оценка линейности)**

Навеска триазавирина, г	Концентрация раствора, мг/мл	Площадь пика
0,0256	0,0256	1820822
0,1253	0,1253	9057475
0,1874	0,1874	13118000
0,2510	0,2510	18114951
0,3125	0,3125	21903822
0,3752	0,3752	2651700

На основании полученных данных была построен график зависимости площади пика от концентрации триазавирина (рис.3).



**Рис. 3.** График зависимости площади пика (по оси ординат) от концентрации триазавирина (по оси абсцисс)

Из рисунка 3 видно, что наблюдается линейная зависимость площади пика от концентрации триазавирина ( $y = 7 \times 10^7 + 100409$ ;  $r = 0,9995$ ) в диапазоне концентраций от 10 до 150% от номинального значения, т.е. в интервале от 0,02 до 0,4 мг/мл. Коэффициент корреляции равен 0,9995, что соответствует рекомендуемым значениям (не менее 0,999).

На следующем этапе оценивалась прецизионность методики в условиях повторяемости.

Повторяемость – это первый уровень прецизионности. Оценка методики количественного определения проводится по независимым результатам, получаемых в одинаковых условиях в одной лаборатории (одним и тем же аналитиком, на одном и том же оборудовании, с использованием одного и того же набора реактивов) в пределах короткого промежутка времени [6].

Определение показателя прецизионность методики в условиях повторяемости проводили на одном исследуемом образце (состав: триазавирин 0,2508 г., морская соль 0,2506 г., вода очищенная до 25 мл.). Определение было проведено 6кратно, количественную концентрацию триазавирина в растворе определяли по градуировочному графику с учетом разведения. Затем рассчитывали относительное стандартное отклонение. Результаты определения прецизионности в условиях повторяемости для триазавирина представлены в таблице 4.



**Результаты определения прецизионности в условиях повторяемости для триазавирина**

№	Площадь пика триазавирина	Найденная концентрация триазавирина, мг/мл
1	17792909	10,11
2	17704912	10,06
3	17968902	10,21
4	18114951	10,29
5	18440409	10,48
6	18580409	10,56
$\bar{X}$	-	10,246
SD	-	0,2003
RSD,%	-	1,95

Расчет показал, что относительное стандартное отклонение составило 1,95%. Полученные данные говорят о том, что методика обладает достаточно хорошей прецизионность в условиях повторяемости.

**Заключение**

Разработанная методика количественного определения триазавирина в фармацевтической композиции для назального применения с использованием метода ВЭЖХ показала хорошие результаты, следовательно, может быть использована в количественном анализе с последующим включением ее в нормативную документацию на ЛФ.

**Список литературы**

1. Киселев О.И. Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. – СПб.: ООО «Издательство «Росток»», 2012. – 272 с.
2. Шаблакова А.С. Исследования по разработке и стандартизации твердых лекарственных форм противовирусного препарата Триазавирина: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук: 14.04.01/ Шаблакова Анна Сергеевна. – Пермь, 2013. – 25с.
3. А.А. Тумашов, Г.А. Артемьев, В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, О.Н. Чупахин, В.Н. Чарушин, Д.С. Копчук. Количественное определение противовирусного препарата Триазаваирин® с использованием метода ВЭЖХ/ Научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств», №6, февраль 2014, С.70-73.

4. Лучшева Ю.В., Изотова Г.Н. Применение препаратов морской воды в оториноларингологии / Русский Медицинский Журнал. - Режим доступа: [http://www.rmj.ru/articles\\_7924.htm](http://www.rmj.ru/articles_7924.htm) (дата обращения: 10.11.2014)
5. Воробьева В.М., Макарова О.Г. Валидационные исследования ВЭЖХ-методики анализа экспериментального препарата «Премелтоп»/ Современные проблемы науки и образования, №5, 2013. <http://www.science-education.ru/pdf/2013/5/121.pdf> (дата обращения: 21.11.2014)
6. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности (методические рекомендации). Часть I-III. М.: - Издательство «Спорт и Культура - 2000», 2007. – 192 с.

**Рецензенты:**

Русинов В.Л., д.х.н., профессор директор химико-технологического института Уральского федерального университета им. Первого Президента России Б.Н. Ельцина, г.Екатеринбург;  
Денисенко О.Н., д.фарм.н., профессор, декан ФУП, заведующий кафедрой фармации Пятигорского МФИ филиала ГБОУ ВПО Волгоградский ГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.