

# Optimization of L-arginine and thiotriazoline compound analysis by high-performance liquid chromatography method

L. I. Kucherenko<sup>1,2</sup>, O. V. Khromylova<sup>1</sup>, I. A. Mazur<sup>1,2</sup>, Z. B. Moriak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine, <sup>2</sup>SPA "Farmatron", Zaporizhzhia, Ukraine

Cardiovascular diseases are the leading cause of death and disability in most countries of the world. Therefore, the crucial task of pharmacy and medicine is the creation of drugs for the treatment of these pathologies. As a result of pharmacological studies, the optimal ratio of L-arginine with thiotriazoline – 4:1 was found. It was proposed to use modern, high-precision method of high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine the active substances in the dosage form.

**Objective.** The purpose of our study is to develop a method for the simultaneous determination of L-arginine and thiotriazoline standardization in model mixture by high-performance liquid chromatography, in particular the selection of the mobile and stationary phase.

**Materials and methods.** L-arginine (manufactured by Sigma-Aldrich, China), thiotriazoline (manufactured by the State Enterprise Chemical Reagents Plant of the Scientific and Technological Complex Institute of Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine) was used for the study. The studies were carried out using a modular BISCHOFF HPLC system (BISCHOFF Analysentechnik GmbH, Germany) with a Lambda 1010 spectrophotometric detector.

**Results.** At first, the determination was carried out on the reverse phase, with L-arginine practically not retained (coming out at the "dead volume"), and the use of cyanated phase did not significantly affect the retention of L-arginine. Further, the retention time of L-arginine increased slightly under ion-pair chromatography on the reversed phase, in determining and using the eluent with tetrabutylammonium. The most acceptable result was obtained by using an ion buffer reagent acid buffer – 0.05 % solution of trifluoroacetic acid.

**Conclusion.** Thus, according to the obtained results, we believe that the use of an acid buffer – 0.05 % solution of trifluoroacetic acid is one of the promising ways for the simultaneous determination of L-arginine with thiotriazoline in the model mixture along with the ion-pair reagent. In the future, we are going to use this technique for the standardization of a combined drug which includes L-arginine and thiotriazoline, in solid and liquid dosage forms.

## Key words:

L-arginine, thiotriazoline, HPLC, cardiovascular diseases, ischemia.

Zaporozhye medical journal 2018; 20 (6), 837–840

## DOI:

10.14739/2310-1210.2018.6.146760

## E-mail:

hromyleva.olga@gmail.com

## Підбір оптимальних умов аналізу суміші L-аргініну з тіотриазоліном методом високоефективної рідинної хроматографії

Л. І. Кучеренко, О. В. Хромильова, І. А. Мазур, З. Б. Моряк

Серцево-судинні захворювання – основна причина смертності та інвалідності населення в багатьох країнах світу. Тому актуальним завданням фармації та медицини є створення лікарських препаратів для лікування цих патологій. У результаті фармакологічних досліджень виявили оптимальне співвідношення L-аргініну з тіотриазоліном – 4:1. Для визначення діючих речовин у лікарській формі запропонували використовувати сучасний високочутливий метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

**Мета роботи** – розроблення методики одночасного визначення L-аргініну та тіотриазоліну в модельній суміші методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), як-от підбір рухомої та нерухомої фази.

**Матеріали та методи.** Для досліджень використовували L-аргінин (виробник «Sigma-Aldrich», КНР), тіотриазолін (ДП «Завод хімічних реактивів» НТК «Інститут монокристалів» НАН України). Дослідження здійснили з використанням модульної системи ВЕРХ BISCHOFF (BISCHOFF Analysentechnik GmbH, ФРН) зі спектрофотометричним детектором Lambda 1010.

**Результати.** Спочатку визначення проводили на оберненій фазі, при цьому L-аргінин практично не утримується (виходить на «мертвому об'ємі»), а використання ціанованої фази позбавило змоги суттєво вплинути на утримування L-аргініну. Далі при визначенні в умовах іонпарної хроматографії на оберненій фазі й використанні елюенту з тетрабутиламонієм дещо збільшився час утримування L-аргініну, а найбільш прийнятний результат отримали, використовуючи поряд з іонпарним реагентом кислого буфера 0,05 % розчину трифтороцтової кислоти.

**Висновки.** Відповідно до отриманих результатів вважаємо перспективним для одночасного визначення L-аргініну з тіотриазоліном у модельній суміші використовувати поряд з іонпарним реагентом кислий буфер – 0,05 % розчин трифтороцтової кислоти. Надалі цю методику плануємо використовувати для стандартизації комбінованого лікарського препарату, до складу якого входять L-аргінин і тіотриазолін у твердих і рідких лікарських формах.

## Ключові слова:

L-аргінин, тіотриазолін, ВЕРХ, серцево-судинні захворювання, ішемія.

Зaporozhskyi meditsynskyi zhurnal. – 2018. – Т. 20, № 6(111). – С. 837–840

## Подбор оптимальных условий анализа смеси L-аргинина с тиотриазолином методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Л. И. Кучеренко, О. В. Хромилёва, И. А. Мазур, З. Б. Моряк

Сердечно-сосудистые заболевания – основная причина смертности и инвалидности населения в большинстве стран мира. Поэтому актуальной задачей фармации и медицины является создание лекарственных препаратов для лечения данных патологий. В результате проведенных фармакологических исследований установлено оптимальное соотношение L-аргинина с тиотриазолином – 4:1. Для определения действующих веществ в лекарственной форме предложено использовать современный, высокочувствительный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

## Ключевые слова:

L-аргинин, тиотриазолин, ВЭЖХ, сердечно-сосудистые заболевания, ишемия.

Запорожский медицинский журнал. – 2018. – Т. 20, № 6(111). – С. 837–840

**Цель работы** – разработка методики одновременного определения L-аргинина и тиотриазолина в модельной смеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а именно подбор подвижной и неподвижной фазы.

**Материалы и методы.** Для исследований использовали L-аргинин (производитель «Sigma-Aldrich», КНР), тиотриазолин (ГП «Завод химических реактивов» НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины). Исследования проводили с использованием модульной системы ВЭЖХ BISCHOFF (BISCHOFF Analysentechnik GmbH, ФРГ) со спектрофотометрическим детектором Lambda 1010.

**Результаты.** Сначала определение проводили на обращенной фазе, при этом L-аргинин практически не удерживается (выходит на «мертвом объеме»), а использование цианированной фазы не позволило существенно повлиять на удерживание L-аргинина. Далее при определении в условиях ионпарной хроматографии на обращенной фазе и использовании элюента с тетрабутиламмонием несколько увеличилось время удерживания L-аргинина, а наиболее приемлемый результат был получен при использовании наряду с ионпарным реагентом кислого буфера – 0,05 % раствора трифторуксусной кислоты.

**Выводы.** Согласно полученным в ходе работы результатам считаем перспективным для одновременного определения L-аргинина с тиотриазолином в модельной смеси использовать наряду с ионпарным реагентом кислый буфер – 0,05 % раствор трифторуксусной кислоты. В дальнейшем эту методику планируем использовать для стандартизации комбинированного лекарственного препарата, в состав которого входят L-аргинин и тиотриазолин в твердых и жидких лекарственных формах.

Cardiovascular diseases are the leading cause of death and disability in most countries of the world. Brain strokes affect up to 35 % of the adult able-bodied population of Ukraine, while up to 25 % of survivors need outside help for the rest of their days. Therefore, the crucial task of pharmacy and medicine is the creation of drugs for the treatment of these pathologies [1,2]. Recently, the issue of the role of nitrogen oxide system, as well as substances related to its metabolism in the prevention of cardiovascular diseases, has been actively discussed. The metabolic precursor of nitric oxide (NO) – the neurotransmitter amino acid L-arginine is of particular interest. The search for the possibility of enhancing the protective properties of L-arginine by combining with substances capable of improving the energy supply of the ischemic myocardium and increasing the bioavailability formed from NO L-arginine is also of undoubted interest. Such substances include thiotriazoline. Thiotriazoline is able to enhance the cardioprotective effect of L-arginine potentiating its NO-mimetic mechanism [3,4]. As a result of the carried out pharmacological studies, the optimal ratio of L-arginine with thiotriazoline – 4:1 was found [3,4]. Such dosage form as tablets was offered for a new combination drug. To date, modern physical-chemical methods of analysis are increasingly being used to standardize drugs. In connection with this, it was offered to use a modern high-precision method of high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine the active substances in the dosage form. This

method allows simultaneously carrying out both identification and quantitation the of active substances in one weight [5–7]. For this, firstly, it is necessary to select the optimal conditions for the analysis of active substances (L-arginine and thiotriazoline), namely the mobile and stationary phases.

### Objective

The purpose of study: to develop a method for the simultaneous determination of L-arginine and thiotriazoline standardization in a model mixture by high-performance liquid chromatography, in particular the selection of the mobile and stationary phase.

### Materials and methods

L-arginine (manufactured by Sigma-Aldrich, China), thiotriazoline (manufactured by the State Enterprise Chemical Reagents Plant of the Scientific and Technological Complex Institute of Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine) was used for the study. The studies were carried out using a modular BISCHOFF HPLC system (BISCHOFF Analysentechnik GmbH, Germany) with a Lambda 1010 spectrophotometric detector. In this work we used the following columns: Prontosil 120-5-CN, Hypersil ODS-C18-5u. Water; 0.05 % aqueous solution of trifluoroacetic acid; Bu<sub>4</sub>NHSO<sub>4</sub> 3.4 g/l in water; Bu<sub>4</sub>NHSO<sub>4</sub> 3.4 g/l,

**Table 1.** The results of the determination of L-arginine and thiotriazoline by HPLC

Sl.No.	Column	Eluent	λ, nm	T <sub>R</sub> , min.		Note
				A	T	
1	Prontosil 120-5-CN	Water	210	1.6	2.3	Aqueous solutions with a concentration of 0.04 mg/ml of L-arginine and thiotriazoline. Double peaks near dead column volume
2	Prontosil 120-5-CN	0.05 % aqueous solution of trifluoroacetic acid	210	~2	4.1	Solutions in the eluent with a concentration of 0.04 mg/ml L-arginine and thiotriazoline. Acceptable peak shape and thiotriazoline retention time. Negative or double peaks of L-arginine.
3	Hypersil ODS-C18-5u	Bu <sub>4</sub> NHSO <sub>4</sub> 3.4 g/l aqueous	210	~2.5	~8	A solution in an eluent with a concentration of 0.04 mg/ml arginine and thiotriazoline. Fuzzy peak of L-arginine. Double peak of thiotriazoline.
4	Hypersil ODS-C18-5u	Bu <sub>4</sub> NHSO <sub>4</sub> 3.4 g/l, 0.02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> aqueous	210	~2.5	~12	A solution in an eluent with a concentration of 0.04 mg/ml L-arginine and thiotriazoline. High background. Negative peak of arginine. Double peak of thiotriazoline.
5	Hypersil ODS-C18-5u	Bu <sub>4</sub> NHSO <sub>4</sub> 3.4 g/l, 0.05% aqueous solution of trifluoroacetic acid	210	2.3	5.2	Solutions in an eluent with 1:1 concentrations of L-arginine and thiotriazoline (0.4 mg/ml). In general, the shape of the peaks has improved. Unidentified peak in 10 min

A: L-arginine, T: thiotriazoline; TR: peak retention time of analyte.

0.02 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in water;  $\text{Bu}_4\text{NHSO}_4$  3.4 g/l, 0.05 % solution of trifluoroacetic acid in water were used as the eluents. In the course of work, glass measuring utensils (class A) were used. The concentrations of active substances were studied in the range from 0.04 mg/ml to 0.4 mg/ml.

## Results and discussion

According to the literature data, the determination of aliphatic amino acids by HPLC, considering their low absorption, is usually carried out after their preliminary derivatization by various modifying reagents [7–9]. However, with the simultaneous determination of L-arginine and thiotriazoline, the use of such derivatization would be impractical. Therefore, in choosing the method of analysis, we stopped at detection in a wavelength of 210 nm without modification of L-arginine.

At first, the determination was carried out on the reverse phase, with L-arginine practically not retained (coming out at the “dead volume”), and the use of cyanated phase did not significantly affect the retention of L-arginine.

Further, the retention time of L-arginine increased slightly under ion-pair chromatography on the reversed phase, in determining and using the eluent with tetrabutylammonium. The most acceptable result was obtained by using an ion buffer reagent acid buffer – 0.05 % solution of trifluoroacetic acid (Table 1).

Therefore, ion-pair chromatography using an acid buffer – 0.05% trifluoroacetic acid solution (Table 1, item 5) was offered to determine L-arginine with thiotriazoline in a model mixture.

The studies were carried out using a modular BIS-CHOFF HPLC system (BISCHOFF Analysentechnik GmbH, Germany) with a Lambda 1010 spectrophotometric detector.

Analysis conditions:

- Column Hypersil ODS-C18-5u, 4.6 × 250 mm, particle diameter 5 μm.
- Eluent: an aqueous solution containing 3.4 g/l  $\text{Bu}_4\text{NHSO}_4$  and 0.05 % trifluoroacetic acid.
- Mobile phase rate: 1 ml/min.
- Detector analytical wavelength: 210 nm.
- Injection volume: 20 μl.

Under these conditions, the retention time of the thiotriazoline peak is about 5.4 min, the retention time of the L-arginine peak is about 2.4 min.

*Preparation of solution.*

Solution 1. 0.01 g (accurate weight) of thiotriazoline is dissolved in 5 ml of eluent in a volumetric flask for 25.0 ml and brought to the mark with the eluent. A solution with a concentration of 0.4 mg/ml is obtained (Fig. 1).

Solution 2. 0.01 g (accurate weight) of L-arginine is dissolved in 5 ml of eluent in a volumetric flask for 25.0 ml and brought to the mark with the eluent. A solution with a concentration of 0.4 mg/ml is obtained (Fig. 2).

Solution 3. 0.01g (accurate weight) of thiotriazoline and 0.01g (accurate weight) of L-arginine are dissolved in 10 ml of eluent in a volumetric flask for 25.0 ml and brought to the mark with an eluent. A solution with a concentration of 0.4 mg/ml of each component is obtained (Fig. 3).

According to modern requirements, we have calculated such factors as the distribution coefficient, the number of theoretical plates, the symmetry factor to determine the efficiency and selectivity of the method.

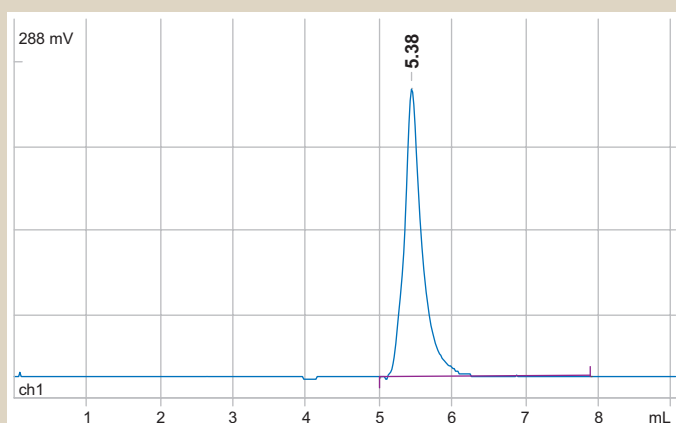


Fig. 1. Chromatogram of thiotriazoline solution.

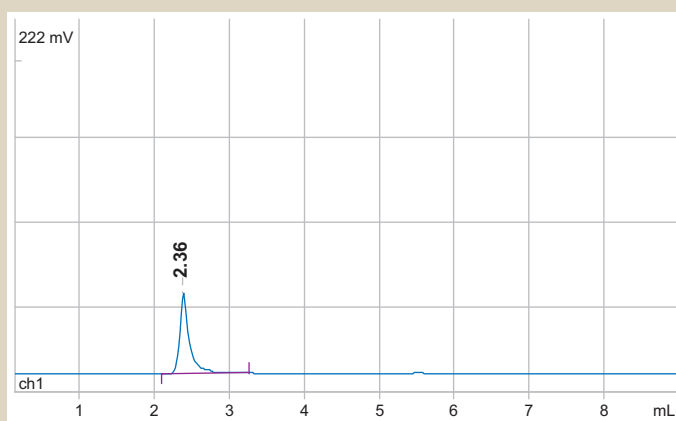


Fig. 2. Chromatogram of L-arginine solution.

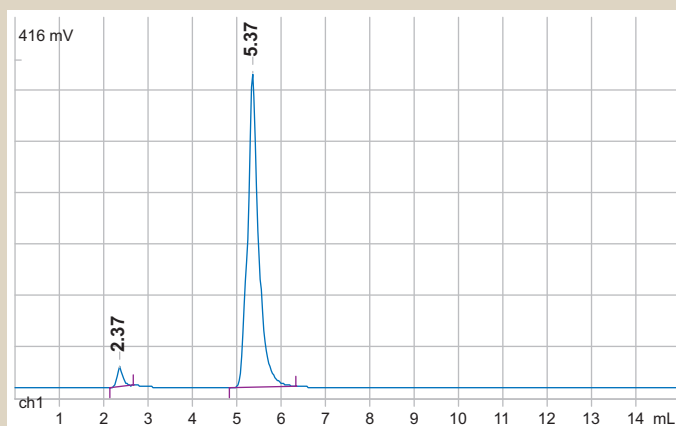


Fig. 3. A chromatogram of the solution of the thiotriazoline and L-arginine mixture with a content of 0.4 mg/ml.

As a result, the following parameters for the suitability of the chromatographic system were obtained: the efficiency of the chromatographic system, calculated by the peak of L-arginine was 2160 theoretical plates, by the peak of thiotriazoline – 3993 theoretical plates; the distribution coefficient of the peaks of L-arginine and thiotriazoline was 11.6; the symmetry factor of the L-arginine peak is – 1.25, thiotriazoline – 1.0).

## Conclusions

Thus, according to the obtained results, we suppose that the use of an acid buffer – 0.05 % solution of trifluoroacetic acid is one of the promising ways for the simultaneous determination of L-arginine with thiotriazoline in the model mixture along with the ion-pair reagent. In the future, we are going to use this technique for the standardization of a combined drug which includes L-arginine and thiotriazoline, in solid and liquid dosage forms.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.  
**Конфлікт інтересів:** відсутній.

## Information about authors:

Kucherenko L. I., Dr.hab., Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Vice-President of SPA "Farmatron", Zaporizhzhia, Ukraine.

Khromylova O. V., PhD, Senior Lecturer of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Mazur I. A., Dr.hab., Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, President of SPA "Farmatron", Zaporizhzhia, Ukraine.

Moriak Z. B., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

## Відомості про авторів:

Кучеренко Л. І., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. фармацевтичної хімії, Запорізький державний медичний університет, віце-президент НВО «Фарматрон», Запоріжжя, Україна.

Хромильова О. В., канд. фарм. наук, старший викладач каф. фармацевтичної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Мазур І. А., д-р фарм. наук, професор каф. фармацевтичної хімії, Запорізький державний медичний університет, президент НВО «Фарматрон», Запоріжжя, Україна.

Моряк З. Б., канд. фарм. наук, доцент каф. фармацевтичної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

## Сведения об авторах:

Кучеренко Л. И., д-р фарм. наук, профессор, зав. каф. фармацевтической химии, Запорожский государственный медицинский университет, вице-президент НПО «Фарматрон», Запорожье, Украина.

Хромилёва О. В., канд. фарм. наук, старший преподаватель каф. фармацевтической химии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Мазур И. А., д-р фарм. наук, профессор, каф. фармацевтической химии, Запорожский государственный медицинский университет, президент НПО «Фарматрон», Запорожье, Украина.

Моряк З. Б., канд. фарм. наук, доцент каф. фармацевтической химии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Надійшло до редакції / Received: 19.04.2018

Після доопрацювання / Revised: 03.05.2018

Прийнято до друку / Accepted: 04.05.2018

## References

- [1] Mazur, I. A., Chekman, I. S., & Belenichev, I. F. (2007). *Metabolitotropnye preparaty [Metabolitotropic Drugs]*. Zaporozhye. [in Russian].
- [2] Mazur, I. A., Voloshin, N. A., Chekman, I. S., Zimenkovskij, B. S., & Stec, V. R. (2005). Tiotriazolin: farmakologicheskie aspektu i klinicheskoe primeneniye [Thiotriazoline: pharmacological aspects and clinical usage]. *Novosti medicyny i farmacii*, 160. [in Russian].

- [3] Mazur, I. A., Chekman, I. S., Belenichev, I. F., & Kucherenko, L. I. (2011). Razrabotka lekarstvennykh sredstv na osnove fiksirovannykh kombinacij s antioksidantami – perspektivnoe napravlenie sovremennoj farmakologii [The development of medicines based on fixed combinations with antioxidants is a promising area of modern pharmacology]. *Farmakologiya ta likarska toksykologiya*, 5, 199–200. [in Russian].
- [4] Mazur, I. A., Kucherenko, L. I., Belenichev, I. F., Khromylova, O. V., Siusiuka, V. H. (patentee) (2016) Patent na vynakhid 110597 Ukraina, MPK (2015.01) A61K 31/198 (2006.01), A61K 9/00. Kombinovanyi likarskyi zasib hepatoprotektonoi, kardioprotektonoi, platsentoprotektyvnoi, tokolitychnoi i NO-mimetychnoi dii [Patent 110597, Ukraine, IPC; (2015.01) A61K 31/198 (2006.01), A61K 9/00. Combination Drug with Hepatoprotective, Cardioprotective, Placentoprotective, Tocolytic and NO-Mimetic Action]. *Biuletyn*, 1. [in Ukrainian].
- [5] Kucherenko, L., Belenichev, I., Mazur, I., & Khromylova, O. (2017). Methabolitotropic aspects of cardioprotective action of new combined medicine based on L-Arginine and Thiotriazolin at modeling of myocardial infarction. *Asian J Pharm Clin Res*, 10(10), 158–161.
- [6] Pakhomov, V. P. (2003). Khromatohrafiya u khimiko-farmatsevtichnykh doslidzhenniakh [Chromatography in chemical and pharmaceutical studies]. *Khimicheskij farmatsevticheskij zhurnal*, 37(8), 55–56. [in Ukrainian].
- [7] Oiestad, E. L., Johansen, U., & Christophersen, A. S. (2007). Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 53, 300–309. doi: 10.1373/clinchem.2006.074237.
- [8] Sadek, P. (2009). *Rastvoriteli dlya VE'ZHKH [Solvents for HPLC]*. Moscow: Binom. Laboratoriya znanij. [in Russian].
- [9] Saprykin, L. V. (2006). Praktika i metodicheskie osnovy vysokoe'fektivnoj zhydkostnoj khromatografii [Practical and methodological foundations of high-performance liquid chromatography]. Krasnodar. [in Russian].