

УДК 543.544

МЕТОДИКА СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОТРИАЗОЛА, ТРИАЗОЛОПИРИМИДИНОНА И НИТРОТРИАЗОЛОПИРИМИДИНОНА – СУБСТРАТА И ПОЛУПРОДУКТОВ СИНТЕЗА 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}, Д.С. Копчук^{1,2*}, О.Н. Чупахин^{1,2}, В.Н. Чарушин^{1,2}

Резюме. Разработана методика совместного определения аминотриазола, триазолопиримидинона и нитротриазолопиримидинона методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Для достижения наилучших хроматографических характеристик предложено использовать колонку с привитой аминофазой Zorbax NH2 (Agilent Technologies, США). Возможность применения разработанной методики для осуществления технологического контроля 2-й стадии процесса получения препарата «Триазид» установлена по итогам проведения валидации.

Ключевые слова: аминотриазол, триазолопиримидинон, нитротриазолопиримидинон, Триазид, ВЭЖХ, валидация.

METHOD OF SIMANTENOUS DETERMINATION OF AMINOTRIAZOLE, TRIAZOLOPYRIMIDINONE AND NITROTRIAZOLOPYRIMIDINONE – SUBSTRATE AND SEMI-PRODUCTS OF SYNTHESIS OF DRUG «TRIAZID» BY HPLC METHOD

A.V. Baklykov¹, A.A. Tumashov^{1,2}, S.K. Kotovskaya^{1,2}, E.N. Ulomskiy^{1,2}, G.L. Rusinov^{1,2}, V.L. Rusinov^{1,2}, D.S. Korchuk^{1,2*}, O.N. Chupakhin^{1,2}, V.N. Charushin^{1,2}

Abstract. A procedure for the simantenous determination of aminotriazole, triazolopyrimidinone and nitrotriazolopyrimidinone 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 aminophase Zorbax NH2 (Agilent Technologies, USA). The possibility of applying the developed methodology for the technological control of the second stage of the drug «Triazid» preparation is established following the results of the validation.

Keywords: aminotriazole, triazolopyrimidinone, nitrotriazolopyrimidinone, triazide, HPLC, validation.

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

2 – ФГБОУ 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. Kovalevskaya / 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: dkorchuk@mail.ru

Тел.: 8 (982) 643 07 77

ВВЕДЕНИЕ

Создание новых лекарственных средств, эффективных в отношении вирусных инфекций, в частности гриппа, является одной из наиболее актуальных и социально значимых задач, поскольку данное заболевание в период сезонных эпидемий поражает заметную часть населения планеты. В этом аспекте также необходимо отметить события последних лет, связанные с распространением птичьего и свиного гриппа, в результате чего важность усиления защиты населения от гриппа становится тем более очевидной. Все это указывает на острую необходи-

мость создания новых противовирусных препаратов [1, 2].

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-а]пиримидинид L-аргининия моногидрат **1**), для которого в настоящее время проводятся клинические испытания [3]. В создании лекарственного средства важной составляющей наряду с эффективнос-

тью и безопасностью является технологичность процесса производства [4].

Процесс получения «Тризида» включает три химические стадии, которые представлены на рисунке 1.

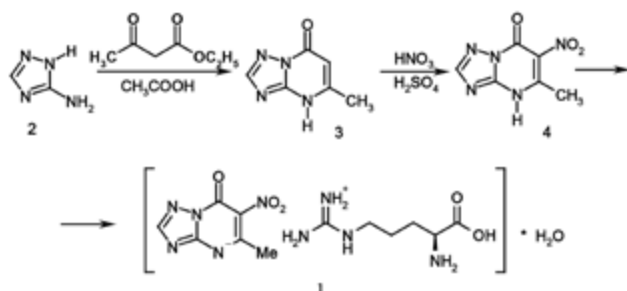


Рисунок 1. Схема стадий процесса получения «Тризида»

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 была предложена методика совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** методом ВЭЖХ [5]. В продолжение этой работы в данной статье нами выполнены разработка и валидация аналитической методики совместного определения аминотриазола **2**, триазолопиримидинона **3**, и нитротриазолопиримидинона **4** методом ВЭЖХ, то есть обеспечена возможность контроля качества полупродукта **4**, получаемого в рамках второй стадии синтеза препарата «Триазид». Целесообразность проведения полной оценки метрологических характеристик обусловлена дальнейшим применением разработанной методики при осуществлении контроля опытно-промышленного и промышленного производства препарата «Триазид».

В литературе ранее с целью определения аминотриазола **2** были описаны такие методы количественного анализа, как газохроматографические [6, 7], методы капиллярного электрофореза [8, 9], методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [10, 11]. Следует отметить, что определение аминотриазола **2** зачастую сопряжено со многими трудностями, и большинство методик предполагает проведение дополнительной процедуры дериватизации. При этом аналитических методик совместного определения аминотриазола **2**, триазолопиримидинона **3** и нитротриазолопиримидинона **4** в литературе не найдено.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали жидкостной хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором и автосамплером, снабженный колонкой Zorbax NH2 длиной 150 мм, внутренним диамет-



Жидкостной хроматограф Agilent 1200

ром 4,6 мм, размер частиц сорбента – 5 мкм (Agilent Technologies, США). Температура колонки – 25 °С. Режим элюирования – изократический. Скорость потока – 1,2 мл/мин. Детектирование осуществляли при следующих длинах волн: 206 нм – для аминотриазола **2**, 270 нм – для триазолопиримидинона **3** и 360 нм – для нитротриазолопиримидинона **4**. Объем вводимой пробы – 10 мкл.

В качестве элюента использовали ацетонитрил (HPLC-grade, Sigma-Aldrich, кат. No i10001, США) и буферный раствор 0,05 М ацетата аммония (Sigma-Aldrich, кат. No 240192, США) в соотношении 30:70.

Субстанция «Тризида» 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. Постовского УрО РАН.

Все используемые субстанции растворяли в элюенте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной задачей, которую необходимо было решить в процессе разработки методики определения полупродукта **4**, а также соединений **2** и **3**, являлся подбор оптимальных хроматографических условий

для эффективного разделения веществ, а именно условий элюирования, состава подвижной фазы и типа колонки.

Первоначально для проведения анализа и разделения исследуемых веществ была опробована ранее разработанная методика совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** [3], предполагающая использование в качестве элюента смеси ацетонитрила и буферного раствора 0,01 М ацетата аммония в 0,1% растворе уксусной кислоты в соотношении 30:70. Было установлено, что время выхода нитротриазолопиримидинона **4** при описанных условиях составляет 44,7 мин, а форма пика не отвечает необходимым критериям симметрии. В ходе варьирования соотношения ацетонитрил – буферный раствор было обнаружено, что время выхода нитротриазолопиримидинона **4** напрямую не зависит от элюирующей силы растворителя (для колонок с привитой аминофазой вода обладает большей элюирующей способностью, чем ацетонитрил [12]). Так, за счет увеличения содержания ацетонитрила в подвижной фазе происходило изменение pH в сторону более щелочной, что приводило к снижению времени удерживания нитротриазолопиримидинона **4**, но, в свою очередь, незначительно увеличивало время выхода триазолопиримидинона **3**. Таким образом, было принято решение об изменении состава подвижной фазы с заменой буферного раствора на более щелочной. Также необходимо учитывать, что при проведении технологического контроля удобно использовать унифицированные реактивы, поэтому при получении удовлетворительных результатов с ацетатом аммония замена его на другую соль нецелесообразна.

При выборе состава подвижной фазы были исследованы различные буферные растворы: 0,01 М ацетат аммония в 0,04% гидроксиде аммония (pH=9); 0,01 М ацетат аммония в 0,01% уксусной кислоте; 0,01 М ацетат аммония, в различных соотношениях с ацетонитрилом и метанолом. При этом лучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве элюента 0,05 М ацетата аммония в соотношении с ацетонитрилом.

Отдельно необходимо отметить, что аминотриазол **2** обладает низкой растворимостью в предлагаемой подвижной фазе, а использование муравьиной кислоты для увеличения его растворимости приводит к появлению на хроматограмме испытуемого образца ее пика, который не разрешается с пиком самого аминотриазола. Поэтому концентрация аминотриазола в пробе в полученной системе не может превышать 0,04 мг/мл, а использование данной методики для промежуточного контроля конверсии первой стадии процесса считается нецелесообразным.

Процедуру валидации разработанной методики осуществляли по следующим параметрам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность [13].

Аналитическая область методики для аминотриазола **2** – от 1 до 10 мг/г, для триазолопиримидинона **3** – 1–20 мг/г, для нитротриазолопиримидинона **4** – 200–1000 мг/г.

Специфичность представляет собой способность достоверно определять анализируемое вещество в присутствии других компонентов и возможных примесей. Для подтверждения специфичности методики получены хроматограммы следующих растворов: нитротриазолопиримидинона **4** (основного определяемого вещества), триазолопиримидинона **3** (примеси), аминотриазола **2** (примеси) и матрицы. Время удерживания пика нитротриазолопиримидинона **4** составило около 4,4 мин, аминотриазола **2** – около 1,7 мин, триазолопиримидинона **3** – около 5,8 мин. На хроматограмме матрицы отсутствуют пики, препятствующие определению основного вещества и примесей в нем, что свидетельствует о возможности применения данной методики для определения исследуемых веществ (рисунок 2).

Линейность методики характеризуется наличием линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Для ее оценки использовали стандартные растворы аминотриазола **2**, триазолопиримидинона **3** и нитротриазолопиримидинона **4**.

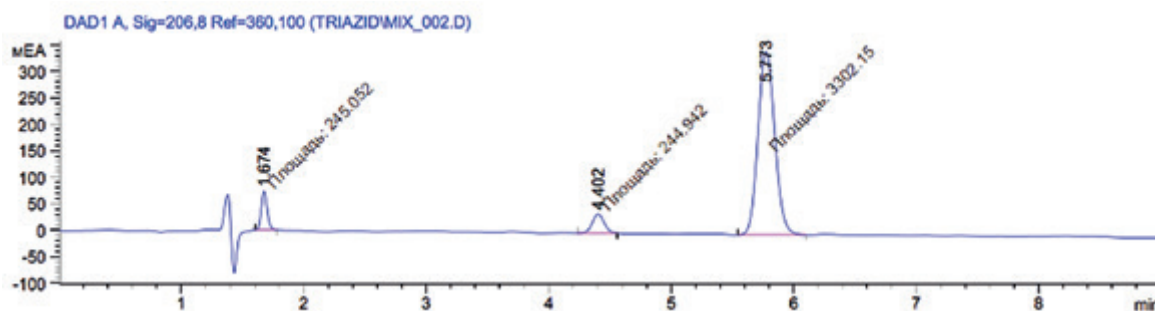


Рисунок 2. Хроматограмма совместного определения аминотриазола **2**, триазолопиримидинона **3** и нитротриазолопиримидинона **4**, 206 нм

нона **4** с номинальными концентрациями от 0,008 до 0,04 мг/мл, от 0,008 до 0,04 мг/мл и от 0,01 до 0,50 мг/мл соответственно (таблицы 1–3). Установлено, что графики зависимости имеют линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций и описываются уравнениями: $y=45546x - 6,9354$ – для аминотриазола (рисунок 3а), $y=54761x - 5,9046$ – для триазолопиримидинона (рисунок 3б) и $y=6166,3x - 2,2687$ – для нитротриазолопиримидинона (рисунок 3с), коэффициент корреляции во всех случаях близок к единице (0,99992, 0,99997 и 0,99999 соответственно).

Таблица 1.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации нитротриазолопиримидинона **4** от площади пика

| Концентрация, мг/мл | Площадь пика, ед ² | | | Среднее значение | СКО, % |
|---------------------|-------------------------------|----------------|----------------|------------------|--------|
| | S ₁ | S ₂ | S ₃ | | |
| 0,010100 | 61 | 62 | 62 | 61,7 | 0,936 |
| 0,101000 | 620 | 614 | 613 | 615,7 | 0,615 |
| 0,505000 | 3113 | 3129 | 3096 | 3112,7 | 0,530 |

Таблица 2.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации триазолопиримидинона **3** от площади пика

| Концентрация, мг/мл | Площадь пика, ед ² | | | Среднее значение | СКО, % |
|---------------------|-------------------------------|----------------|----------------|------------------|--------|
| | S ₁ | S ₂ | S ₃ | | |
| 0,007984 | 418 | 429 | 425 | 424,0 | 1,313 |
| 0,019960 | 1075 | 1101 | 1085 | 1087,0 | 1,207 |
| 0,039920 | 2189 | 2155 | 2201 | 2181,7 | 1,094 |

Таблица 3.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации аминотриазола **2** от площади пика

| Концентрация, мг/мл | Площадь пика, ед ² | | | Среднее значение | СКО, % |
|---------------------|-------------------------------|----------------|----------------|------------------|--------|
| | S ₁ | S ₂ | S ₃ | | |
| 0,00808 | 342 | 361 | 350 | 351,0 | 2,718 |
| 0,0202 | 935 | 910 | 901 | 915,3 | 1,925 |
| 0,0404 | 1805 | 1857 | 1840 | 1834,0 | 1,446 |

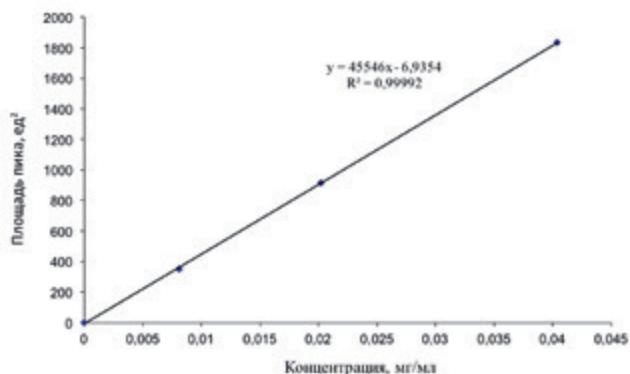


Рисунок 3а. График зависимости концентрации от площади пика для аминотриазола **2**

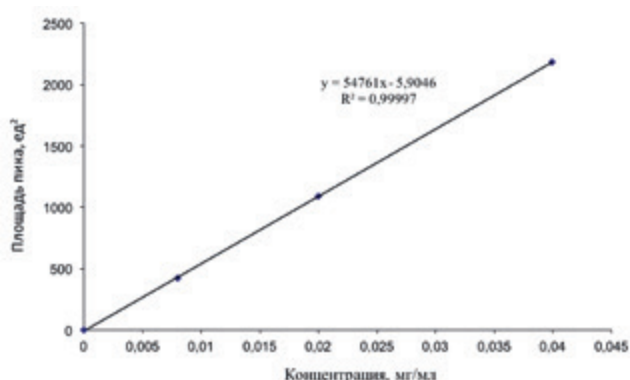


Рисунок 3б. График зависимости концентрации от площади пика для триазолопиримидинона **3**

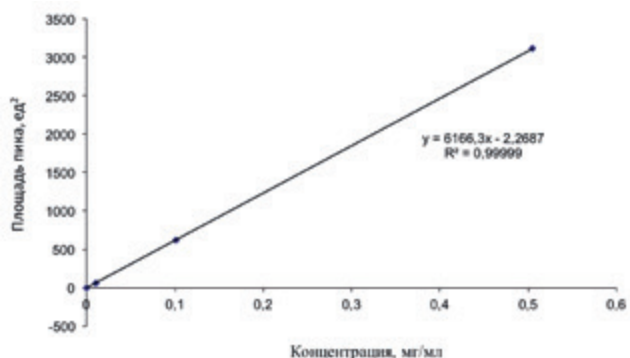


Рисунок 3с. График зависимости концентрации от площади пика для нитротриазолопиримидинона **4**

Правильность характеризует близость результатов, получаемых с помощью данной методики, к истинному значению. Правильность методики устанавливали по результатам анализа методом добавок (таблица 4).

Предел количественного определения аминотриазола **2** составил 0,30 мкг/мл, триазолопиримидинона **3** – 0,15 мкг/мл, нитротриазолопиримидинона **4** – 1 мкг/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%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования разработана оптимизированная методика совместного определения аминотриазола **2**, триазолопиримидинона **3** и нитротриазолопиримидинона **4** с по-

мощью 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 примеси исходных веществ до 0,01% от основного вещества.

Таблица 4.

Данные для оценки правильности методики

| Введенное кол-во в образец, мг/мл | Результат, мг/мл | Процент восстановления, % | Среднее значение результатов, мг/мл | СКО, % | Коэффициент вариации |
|-----------------------------------|------------------|---------------------------|-------------------------------------|--------|----------------------|
| Нитротриазолопиримидион | | | | | |
| 0,0101 | 0,01001 | 99,11 | 0,01020 | 0,018 | 1,773 |
| | 0,01022 | 101,19 | | | |
| | 0,01037 | 102,67 | | | |
| 0,101 | 0,1019 | 100,89 | 0,1021 | 0,072 | 0,706 |
| | 0,1015 | 100,50 | | | |
| | 0,1029 | 101,88 | | | |
| 0,5050 | 0,5011 | 99,23 | 0,5023 | 0,139 | 0,276 |
| | 0,5038 | 99,76 | | | |
| | 0,5019 | 99,39 | | | |
| Триазолопиримидион | | | | | |
| 0,00798 | 0,00797 | 99,85 | 0,00798 | 0,002 | 0,197 |
| | 0,00796 | 99,71 | | | |
| | 0,00799 | 100,10 | | | |
| 0,01996 | 0,02010 | 100,70 | 0,0201 | 0,015 | 0,729 |
| | 0,02021 | 101,25 | | | |
| | 0,01992 | 99,80 | | | |
| 0,03992 | 0,04030 | 100,95 | 0,0402 | 0,027 | 0,668 |
| | 0,04038 | 101,15 | | | |
| | 0,03988 | 99,90 | | | |
| Аминотриазол | | | | | |
| 0,00808 | 0,00810 | 100,25 | 0,00809 | 0,009 | 1,115 |
| | 0,00817 | 101,11 | | | |
| | 0,00799 | 98,90 | | | |
| 0,02020 | 0,01992 | 98,61 | 0,0200 | 0,013 | 0,661 |
| | 0,02017 | 99,85 | | | |
| | 0,01997 | 98,86 | | | |
| 0,04040 | 0,04021 | 99,53 | 0,0401 | 0,040 | 0,984 |
| | 0,04049 | 100,22 | | | |
| | 0,03971 | 98,29 | | | |

Проведена валидация разработанной аналитической методики, по результатам которой показана возможность ее применения для контроля второй стадии технологического процесса получения опытно-

промышленных и промышленных партий препарата «Триазид». Данная методика была успешно применена для анализа опытных партий препарата.

ЛИТЕРАТУРА

- О.И. Киселев Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. – СПб: Росток. 2012. 272 с.
- Г.А. Артемьев. Разработка технологии производства субстанции противовирусного препарата «Триазавирин»: дис. ... к.т.н. – Екатеринбург: УрФУ, ИОС УрО РАН, 2017. 157 с.
- Патент РФ 2529487. 5-Метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинид l-аргининия моногидрат / О.Н. Чухахин, 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. 15.04.2013; опубл. 27.09.2014.
- Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».
- А.В. Баклыков, А.А. Тумашов, С.К. Котовская, Е.Н. Уломский, Г.Л. Русинов, В.Л. Русинов, О.Н. Чухахин, В.Н. Чарушин. Методика совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона – субстрата и полупродукта синтеза лекарственного препарата «Триазид» – методом ВЭЖХ // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 2(19). С. 44–48.
- J.M. van der Poll, M. Vink, J.K. Quirijns. Determination of amitrole in plant tissues and sandy soils by capillary gas chromatography with alkali flame ionization detection // Chromatographia. 1990. V. 30. P. 155–158.
- M. Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, M. Moreno. Determination of 3-amino-1,2,4-triazole (amitrole) in environmental waters by capillary electrophoresis // Talanta. 2003. V. 59. P. 37–45.
- S. Takeda, K. Fukushi, K. Chayama, Y. Nakayama, Y. Tanaka, S. Wakida. Simultaneous separation and on-line concentration of amitrole and benzimidazole pesticides by capillary electrophoresis with a volatile migration buffer applicable to mass spectrometric detection // J. of Chrom. A. 2004. V. 1051. P. 297–301.
- B.V. Pepich, B. Prakash, M.M. Domino, T.A. Dattilio, D.J. Munch, E.K. Price. Development of U.S. EPA Method 527 for the Analysis of Selected Pesticides and Flame Retardants in the UCMR Surve // Environ. Sci. Technol. 2005. V. 39. P. 4996–5004.
- M. Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, M. Moreno. Determination of 3-amino-1,2,4-triazole (amitrole) in environmental waters by capillary electrophoresis // Talanta. 2003. V. 59. P. 37–45.
- S. Takeda, K. Fukushi, K. Chayama, Y. Nakayama, Y. Tanaka, S. Wakida. Simultaneous separation and on-line concentration of amitrole and benzimidazole pesticides by capillary electrophoresis with a volatile migration buffer applicable to mass spectrometric detection // J. of Chrom. A. 2004. V. 1051. P. 297–301.
- J. Dugay, M.-C. Hennion. Evaluation of the performance of analytical procedures for the trace-level determination of aminotriazole in drinking waters // Trends in Anal. Chem. 1995. V. 14. P. 407–414.
- Y. Sun, L. Luo, F. Wang, J. Li, Y. Cao. Ion-pairing high-performance liquid chromatography determination of amitrole in apple after solid-phase extraction and precolumn derivatization // Anal. and Bioanal. Chem. 2009. V. 395. P. 465–471.
- С.Н. Сычев, В.А. Гаврилина Высокоэффективная жидкостная хроматография. – СПб.: Лань, 2013. 256 с.
- ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I.