УДК 543.544

МЕТОДИКА СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОТРИАЗОЛА И ТРИАЗОЛОПИРИМИДИНОНА – СУБСТРАТА И ПОЛУПРОДУКТА СИНТЕЗА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «ТРИАЗИД» МЕТОДОМ ВЭЖХ

А.В. Баклыков[1]*, 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], О.Н. Чупахин[1,2], В.Н. Чарушин[1,2]

Резюме. Разработана методика совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Для достижения наилучших хроматографических характеристик предложено использовать колонку с привитой аминофазой Zorbax NH_2 (Agilent Technologies, США). Возможность применения разработанной методики для осуществления технологического контроля первой стадии процесса получения препарата «Триазид» установлена по итогам проведения валидации.

Ключевые слова: аминотриазол, триазолопиримидинон, «Триазид», ВЭЖХ, валидация.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF AMINOTRIAZOLE AND TRIAZOLOPYRIMIDINONE – SUBSTRATE AND INTERMEDIATE IN THE SYNTHESIS OF «TRIAZIDE» BY HPLC

A.V. Baklykov[1]*, 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], O.N. Chupahin[1,2], V.N. Charushin[1,2]

Abstract. Method of simultaneous determination of aminotriazole and triazolopyrimidinone using HPLC with UV-detection was developed. For best chromatographic performance Zorbax NH_2 amino phase column (Agilent Technologies, USA) was selected. The applicability of the developed method for providing technological control of the 1st stage of «Triazide» production was approved according to the results of validation procedure.

Keywords: aminotriazole, triazolopyrimidinone, «Triazide», HPLC, validation.

1 – ФГБУН Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 620990, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 22 / Академическая, д. 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, S. Kovalevskaya str. / 20, Academicheskaya 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: art.baklykov@gmail.com
Тел.: 8 (982) 643 07 77

ВВЕДЕНИЕ

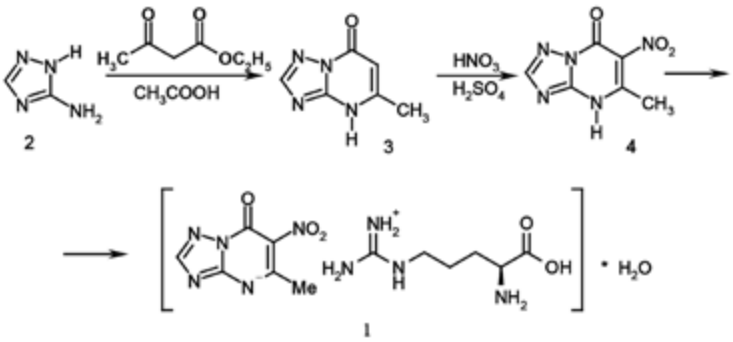
Одним из приоритетных направлений в области инновационного развития фармацевтической промышленности является разработка лекарственных средств для лечения и профилактики вирусных заболеваний. В результате совместных исследований Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Уральского федерального университета им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, НИИ гриппа МЗ РФ и ПАО «Отисифарм» разработан оригинальный противовирусный препарат «Триазид» (5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида *l*-аргинииния, моногидрат **1**), для которого проводятся клинические испытания [1]. В создании лекарственного средства важной составляющей наряду с эффективностью и безопасностью является технологичность процесса производства [2].

Процесс получения «Триазида» включает три химические стадии:

– циклоконденсация 5-амино-3-Н-1,2,4-триазола **2** (аминотриазола) с ацетоуксусным эфиром при кипячении в уксусной кислоте с образованием 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она **3** (триазолопиримидинона);

– нитрование триазолопиримидинона **3** нитрующей смесью с образованием 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она **4**;

– получение «Триазида» (5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида *l*-аргинииния **1)** при обработке соединения **4** *l*-аргинином.



Технологический контроль при проведении масштабирования технологии получения препарата и наработке опытно-промышленных партий занимает важное место в производстве лекарственных препаратов [2]. В процессе масштабирования и наработки опытно-промышленных партий субстанции препарата «Триазид» особое внимание уделялось методам контроля качества получаемых полупродуктов и продуктов синтеза.

На первой стадии процесса – циклоконденсации аминотриазола **2** в триазолопиримидинон **3** контролировали степень конверсии исходного субстрата, проводили количественную оценку содержания получаемого полупродукта **3** и содержания в нем примеси исходного вещества **2**.

В литературе описаны различные методы определения аминотриазола: газохроматографические [3, 4], методы капиллярного электрофореза [5, 6], методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [7, 8]. Определение аминотриазола сопряжено со многими трудностями, и большинство методик предполагает проведение дополнительной процедуры дериватизации. Аналитических методик совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона в литературе не найдено.

Целью данного исследования является разработка и валидация аналитической методики совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** – субстрата и полупродукта синтеза препарата «Триазид» – методом ВЭЖХ. Целесообразность проведения полной оценки метрологических характеристик обусловлена дальнейшим применением разработанной методики при осуществлении контроля опытно-промышленного и промышленного производства препарата «Триазид».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали жидкостной хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором и автосамплером, снабженный колонкой Zorbax NH_2 длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм (Agilent Technologies, США). Температуры колонки – 25 °С, температура автосамплера – комнатная. Режим элюирования – изократический. Скорость потока – 0,8 мл/мин. Детектирование осуществляли при длине волны 206 нм для аминотриазола **2** (рисунок 1), и при 270 нм – для триазолопиримидинона **3** (рисунок 2). Объем вводимой пробы – 10 мкл.

В качестве элюента использовали ацетонитрил (HPLC-grade, Sigma-Aldrich, США кат. № i10001) и буферный раствор 0,01 М ацетата аммония (Sigma-Aldrich, США кат. № 240192) в 0,1 % уксусной кислоте (х.ч. ледяная, ЗАО «Химреактивснаб», Россия) в соотношении 30:70.

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

Все используемые субстанции растворяли в 1% растворе муравьиной кислоты (ч., ЗАО «Вектон», Россия).

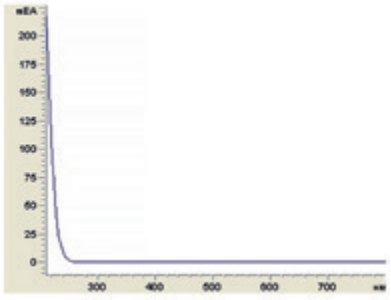


Рисунок 1. **УФ-спектр аминотриазола**

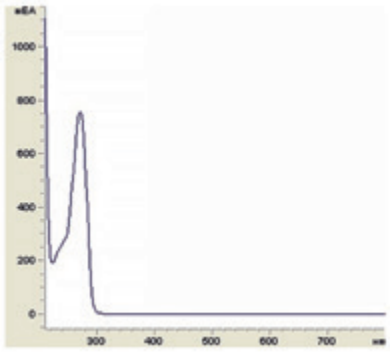


Рисунок 2. **УФ-спектр триазолопиримидинона**

Жидкостной хроматограф Agilent 1200

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке методики необходимо было подобрать оптимальные хроматографические условия для эффективного разделения веществ: тип колонки, состав подвижной фазы, условия элюирования.

Первоначально для проведения анализа и разделения исследуемых веществ использовали наиболее часто применяемую колонку с привитой обращенной фазой C_{18}, но время удерживания и разрешение пиков оказались недостаточными для проведения точного количественного определения. Поэтому было решено опробовать колонки с привитой аминофазой для определения полярных соединений – Zorbax NH_2 (амино-пропилсилановая фаза, Agilent Technologies, США) и Supelcosil LC-NH_2 (амино-пропиловая фаза, Supelco, США). Лучшие результаты были получены на колонке Zorbax NH_2, обеспечивающей наибольшую симметричность пиков при меньшем времени анализа по сравнению с колонкой Supelcosil LC-NH_2.

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 0,02% уксусной кислоте (pH=5); 0,01 М ацетата аммония в 0,1% уксусной кислоте; 0,1% муравьиная кислота в воде, в различных соотношениях с ацетонитрилом и метанолом. Лучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве элюента 0,01 М ацетата аммония в 0,1% уксусной кислоте (рисунки 3а – 3с).

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

Аналитическая область методики для аминотриазола **2** – от 1 до 10 мг/г, для триазолопиримидинона **3** – 210–1050 мг/г.

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

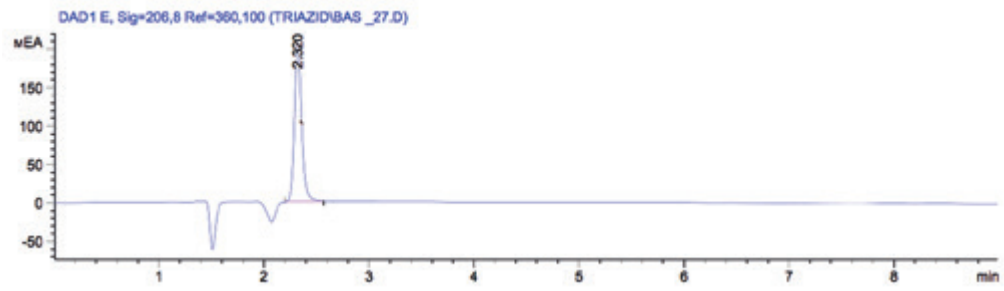


Рисунок 3a. **Хроматограмма аминотриазола, 206 нм**

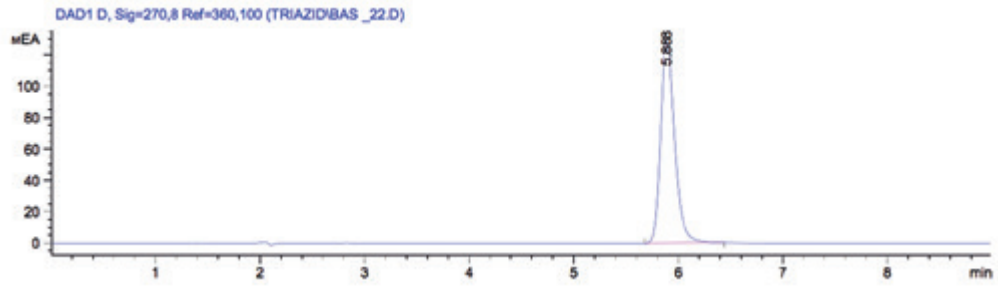


Рисунок 3b. **Хроматограмма триазолопиримидинона, 270 нм**

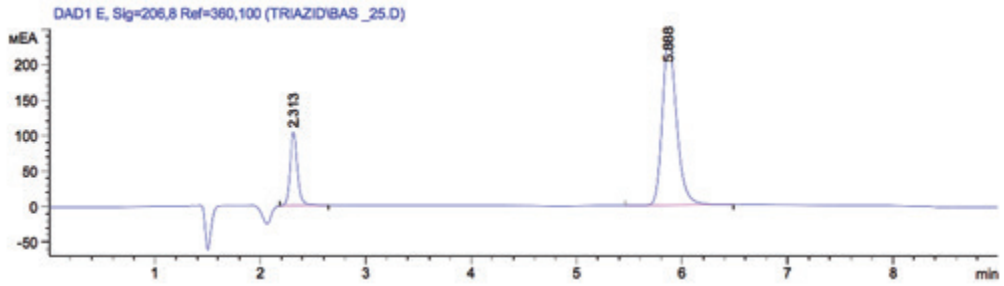


Рисунок 3с. **Хроматограмма совместного определения аминотриазола, 206 нм, и триазолопиримидинона, 270 нм**

Для оценки линейности использовали стандартные растворы аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** с номинальными концентрациями от 0,008 до 0,04 мг/мл (таблицы 1, 2). Установлено, что графики зависимости имеют линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций и описываются уравнениями: y=23826x+1,7474 для аминотриазола (рисунок 4a) и y=30211x+3,8517 для триазолопиримидинона (рисунок 4b), коэффициент корреляции в обоих случаях близок к единице (0,9994 и 0,99994 соответственно).

Правильность характеризует близость результатов, получаемых с помощью данной методики, к истинному значению. Правильность методики устанавливали по результатам анализа методом добавок (таблица 3).

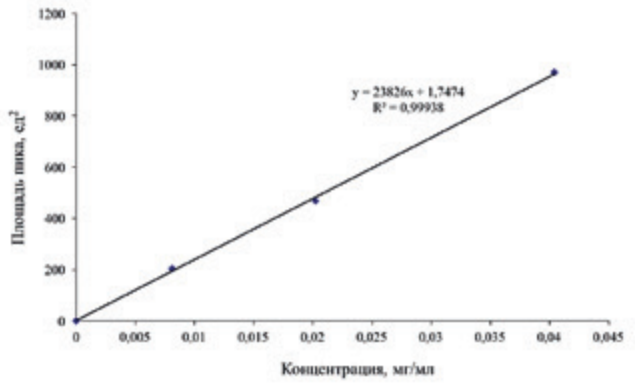


Рисунок 4a. **График зависимости концентрации от площади пика для аминотриазола**

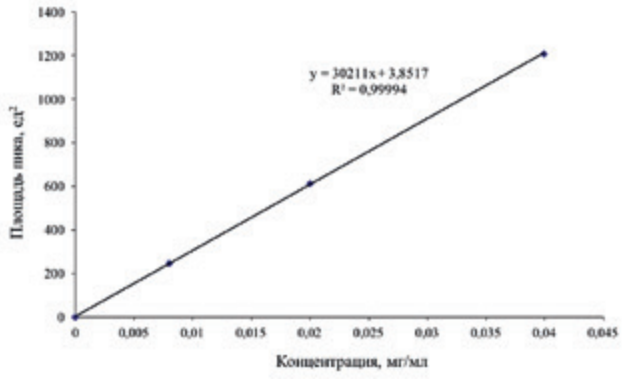


Рисунок 4b. **График зависимости концентрации от площади пика для триазолопиримидинона**

Таблица 1.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации аминотриазола от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед²			Среднее значение	СКО, %
	S_1	S_2	S_3		
0,008080	205	209	201	205,0	1,951
0,020200	470	463	475	469,3	1,284
0,040400	980	944	983	969,0	2,240

Таблица 2.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации триазолопиримидинона от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед²			Среднее значение	СКО, %
	S_1	S_2	S_3		
0,007984	247	248	245	246,7	0,619
0,019960	611	613	612	612,0	0,163
0,039920	1209	1205	1207	1207,0	0,166

Специфичность представляет собой способность достоверно определять анализируемое вещество в присутствии других компонентов и возможных примесей. Для подтверждения специфичности методики получены хроматограммы следующих растворов: триазолопиримидинона **3** (определяемого основного вещества), аминотриазола **2** (примеси) и матрицы. Время удерживания пика триазолопиримидинона составило около 6,2 мин, аминотриазола – около 2 мин. На хроматограмме матрицы отсутствуют пики, мешающие определению основного вещества и примеси в нем, что свидетельствует о возможности применения данной методики для определения исследуемых веществ.

Таблица 3.

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
Аминотриазол					
0,00808	0,00810	100,25	0,00808	0,002	0,258
	0,00809	100,12			
	0,00806	99,75			
0,0202	0,0200	99,01	0,0203	0,055	2,718
	0,0199	98,51			
	0,0209	103,47			
0,0404	0,0409	101,24	0,0402	0,062	1,553
	0,0397	98,27			
	0,0400	99,01			
Триазолопиримидинон					
0,007984	0,007992	100,10	0,00798	0,001	0,138
	0,007970	99,82			
	0,007982	99,97			
0,01996	0,02006	100,50	0,0200	0,007	0,333
	0,01993	99,85			
	0,02002	100,30			
0,03992	0,04000	100,20	0,0400	0,014	0,338
	0,03988	99,90			
	0,04015	100,58			

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 2 %. Коэффициент вариации испытаний при определении внутрилабораторной прецизионности (три рабочих дня, два оператора) составил менее 3%.

Предел количественного определения устанавливали через отношение аналитического сигнала к уровню шума. Минимальная концентрация аминотриазола **2**, при которой величина данного отношения – около 10:1, составляет 0,004 мг/мл, триазолопиримидинона **3** – 0,003 мг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования разработана методика совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона посредством 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 исходного вещества до 0,10 % от основного вещества.

Проведена валидация разработанной аналитической методики, по результатам которой показана возможность ее применения для контроля первой стадии технологического процесса получения опытно-промышленных и промышленных партий препарата «Триазид».

Данная методика была успешно применена для анализа опытных партий препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент № 2529487 РФ. 5-Метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинид l-аргинииния моногидрат / О.Н. Чупахин, 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.
2. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. I. – М.: НЦЭСМП.