

УДК 576.858.097.22:615.28

А. В. МАРТИНОВ, В. Ф. ПЕРШИН,
С. М. КУЗНЕЦОВА

ВИКОРИСТАННЯ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ВИСОКОГО ТИСКУ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ СУБСТАНЦІЇ ТА ЕТАПІВ І ДИНАМІКИ СИНТЕЗУ ПРОТИВІРУСНОГО ПРЕПАРАТУ ГАММАВІР

В работе представлены результаты использования жидкостной хроматографии высокого давления для контроля качества субстанции и этапов динамики синтеза противовирусного препарата Гаммавир, который представляет собой трициклическое соединение и имеет множество изомеров. Исследовались: динамика синтеза промежуточного и конечного продукта и наличие примесей в конечном продукте. Показано, что синтез промежуточного соединения – ди글укопиранозил-пиридазина соответствует спрогнозированной схеме: в реакционной смеси присутствует три отдельные соединения – изомеры. Эти соединения являются неконденсированными полупродуктами реакции. Субстанция препарата Гаммавир соответствует условиям фармакопейной статьи и содержит примеси в допустимых пределах. При исследовании последнего этапа синтеза Гаммавира было установлено, что механизм синтеза значительно сложнее того, что был сперва предложен: в реакционной смеси через 10 мин после начала реакции присутствуют более 18 промежуточных соединений, которые исчезают в течение синтеза Гаммавира. Таким образом, можно сделать вывод о целесообразности использования жидкостной хроматографии при разработке технологий промышленного синтеза лекарственных субстанций, контроле промежуточных стадий синтеза, анализе чистоты и качества синтезированных соединений, особенно субстанций веществ, которые содержат несколько изомеров и полупродуктов синтеза.

Article presents the results of high-pressure liquid chromatography usage for quality surveillance of a substance and stages of antiviral drug Gammavir synthesis dynamics, which represents threecyclic structure and has set of isomers. Were investigated: synthesis dynamics of intermediate and finished products and presence of admixings in finished products. The investigation has shown, that the synthesis of intermediate compound - diglucopyranosyl-ortho-diazine corresponds with forecasted synthesis scheme: reaction mixture contains three separate substances – isomers. These substances are noncondensated intermediates of the reaction. Gammavir substance corresponds to conditions of pharmacopoeia article, though contains admixings but within acceptable limits. The last stage of Gammavir synthesis research has shown, that the mechanism of synthesis is much more complex than that it was first suggested: 10 minutes after the reaction start the reaction mixture contains more than 18 intermediate compounds, which are vanishing during Gammavir synthesis. Thus, there could be made a conclusion about

expediency of liquid chromatography usage during development of industrial synthesis technologies for medicinal substances, intermediate synthesis stages control, synthesized substances purity and quality analysis, especially for those substances, which contain several isomers and synthesis intermediates.

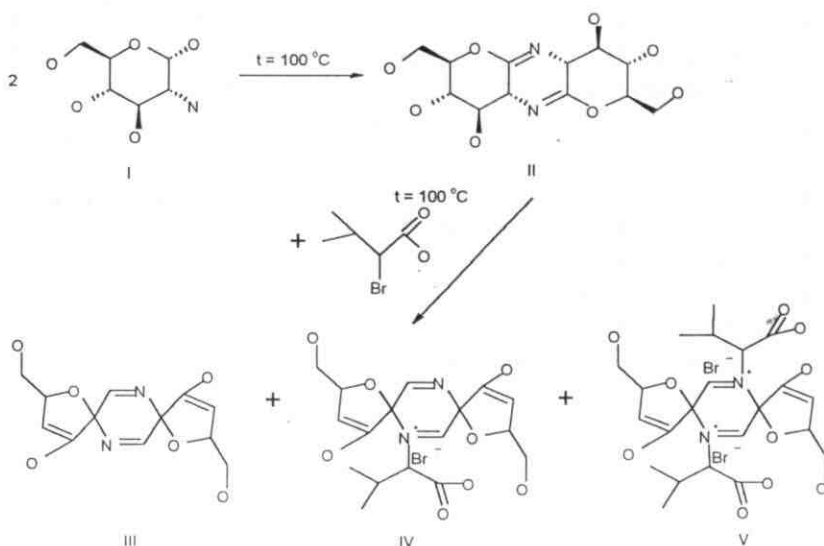
Останнім часом все частіше для аналізу фармакологічних субстанцій та контролю проміжних технологічних стадій їх синтезу використовують рідинну хроматографію високого тиску [1]. Це пов'язано, по-перше, із зменшенням терміну проведення процедури аналізу (5–30 хв), по-друге, з можливістю детектування піків при декількох довжинах хвиль як в УФ-зоні, так і у видимій зоні спектру. Останній факт дозволяє характеризувати кожну смугу та стандартизувати субстанцію і домішки [2, 3].

Гаммавір являє собою конденсоване похідне глюкозаміну, яке утворюється в умовах окиснення. Ця речовина відноситься до класу інгібіторів інтегрази [4]. Вона проявила значні противірусні властивості по відношенню до вірусів герпесу, грипу, цитомегаловірусу та інших вірусів. Гаммавір розроблено в Інституті мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України та впроваджується у виробництво в НТК “Інститут монокристалів” НАН України. При розробленні оптимальної технології синтезу було запропоновано декілька методів синтезу Гаммавіру, але всі синтезовані субстанції мають незначний вихід та багато домішок – продуктів окиснення глюкозаміну.

Основною метою досліджень було встановити можливість контролю етапів синтезу та аналізу субстанції Гаммавір на наявність і кількість домішок за допомогою методу рідинної хроматографії високого тиску.

Матеріали та методи

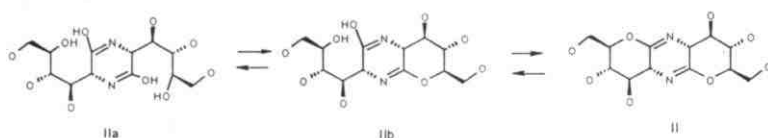
Синтез Гаммавіру складався з двох етапів – окиснення глюкозаміну (I) та окиснення і конденсації похідного II до похідних III–V.



Препарат Гаммавір, отриманий декількома методами, був представлений для досліджень завідувачем відділу нових технологій НТК “Інститут монокристалів”, професором Конєвим В. Ф. Як видно із схеми, кінцевий продукт складається з трьох продуктів окиснення III–V. Окрім того, Гаммавір є аморфною, прозорою речовиною, що не кристалізується. Хоча структура базової речовини V підтверджена даними ІЧ- та ПМР-спектроскопії, але відсутність функціональних груп ізовалеріанової кислоти у положенні 6 та 14 зовсім не відзначається на ПМР- та ІЧ-спектрах (речовина III є сіллю 2-бромізовалеріанової кислоти). Стандартизувати Гаммавір за цими методами фактично неможливо – через складності встановлення концентрації та характеристик ізомерів III та IV. Тому аналіз продуктів синтезу методом було проведено рідинної хроматографії високого тиску на хроматографі Мілліхром А-02/ Розділення компонентів суміші здійснювали на колонці довжиною 74 мм та діаметром 3 мм з оберненофазовим сорбентом “нуклеосил С-18” № 3 при максимальному тиску 2,3 МПа у режимі градієнтного елювання [5]. Як елюент А використовували перхлорат літію, як елюент В – ацетонітрил. Гаммавір та напівпродукт II розчиняли в ацетонітрилі у концентрації 0,1 %. Використовували багатохвильовий УФ-детектор зі змінною довжиною хвилі.

Результати та обговорення

Як видно із структури препарату, кільця Гаммавіру не знаходяться в одній площині – фуранові кільця знаходяться у перпендикулярному положенні до піразинового кільця. Відповідно, можлива наявність двох ізомерів: коли фурановий кисень в обох залишках фурану знаходиться з одного боку піразинового кільця (цис-положення) та коли фуранові гідроксили розташовані у транс-положенні до площини кільця піразину. Окрім того, можливі цис- та транс-положення карбоксильних груп відносно площини кільця. Таким чином, можливими є чотири конформаційних ізомери Гаммавіру (V). Тобто на хроматограмі має бути всього 6–7 піків, серед яких за концентрацією (висотою піку) повинна виділятися речовина V; у меншій концентрації будуть представлені речовини III та IV. Речовина II також може бути присутньою, але з технологічної точки зору це небажано, бо свідчить про незавершенність реакції конденсації. Також були отримані хроматограми продуктів першої стадії синтезу (I та II). Глюкозаміну гідрохлорид фактично не розчиняється в ацетонітрилі та не поглинає в УФ та видимій області спектру. Тому при наявності його у розчині детектувати його неможливо. Речовина II може знаходитися у вигляді як тричленного гетероциклу (II), так і у вигляді двох ізомерів (IIa та IIb) – коли одне чи обидва кільця не циклізовані:



Таким чином, на хроматограмі проміжного продукту II можуть з'явитися три смуги.

Результати аналізу чистої заводської субстанції Гаммавіру представлено у вигляді хроматограми на рисунку 1.

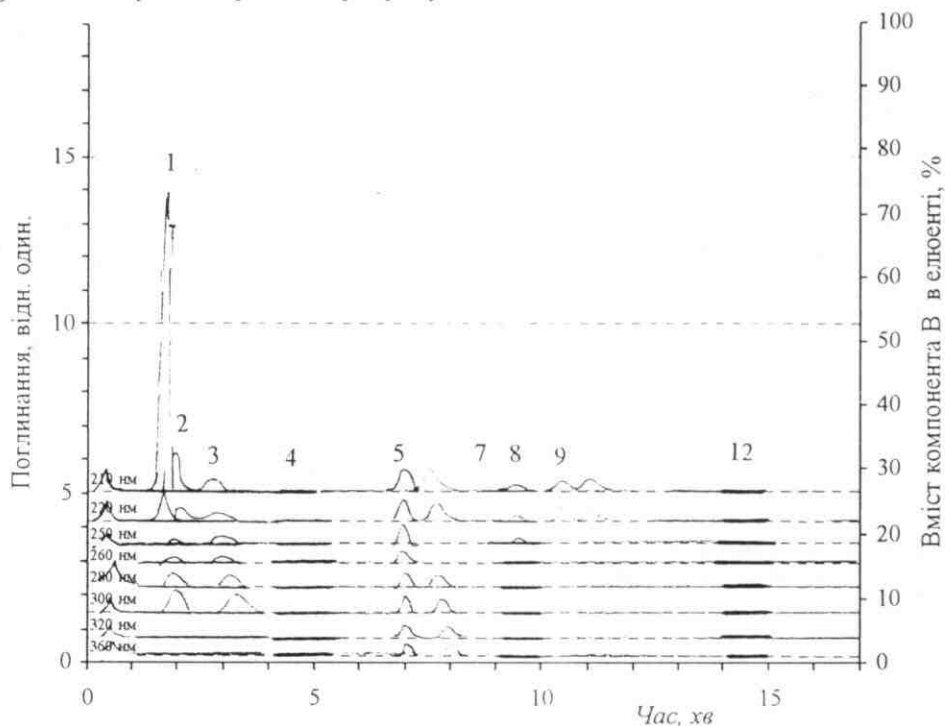


Рис. 1. Хроматограма чистої заводської субстанції Гаммавіру

Згідно з одержаними даними, основним компонентом заводської субстанції Гаммавір є цільовий продукт (пік 1 на хроматограмі). Домішки (піки 2–12) містяться у концентрації < 100 нг/мл.

Друга стадія реакції йде протягом 1 год, для контролю її перебігу була взята проба з реакційної суміші через 10 та 30 хв, відповідно, а реакція була зупинена охолодженням реакційної суміші до кімнатної температури. Хроматограми напівпродуктів з реакційної суміші представлені на рисунках 2 та 3.

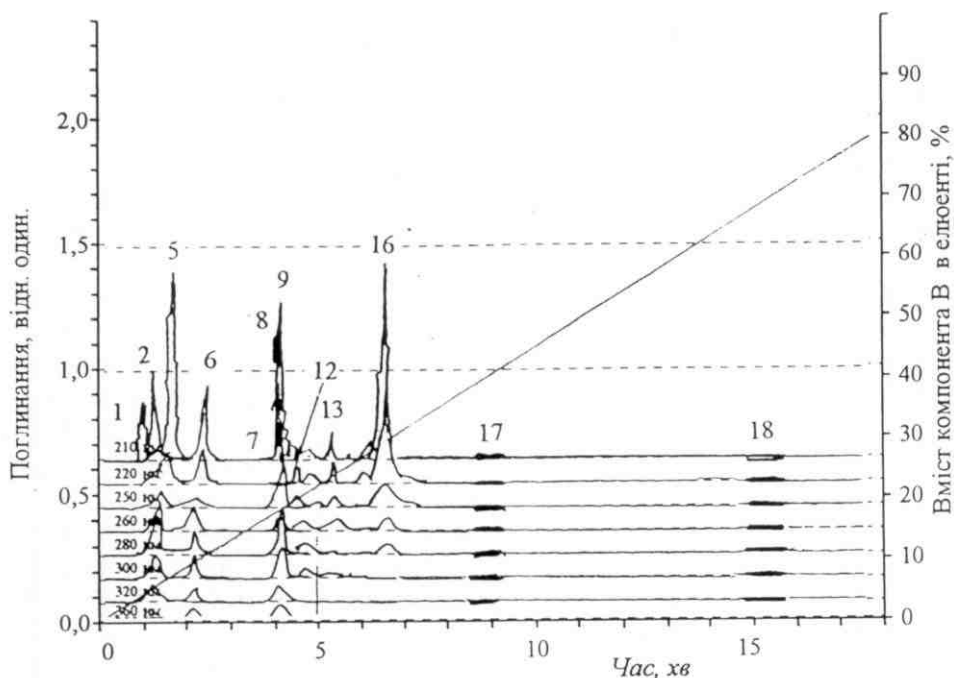


Рис. 2. Хроматограма проби з реакційної суміші через 10 хв після початку другої стадії синтезу

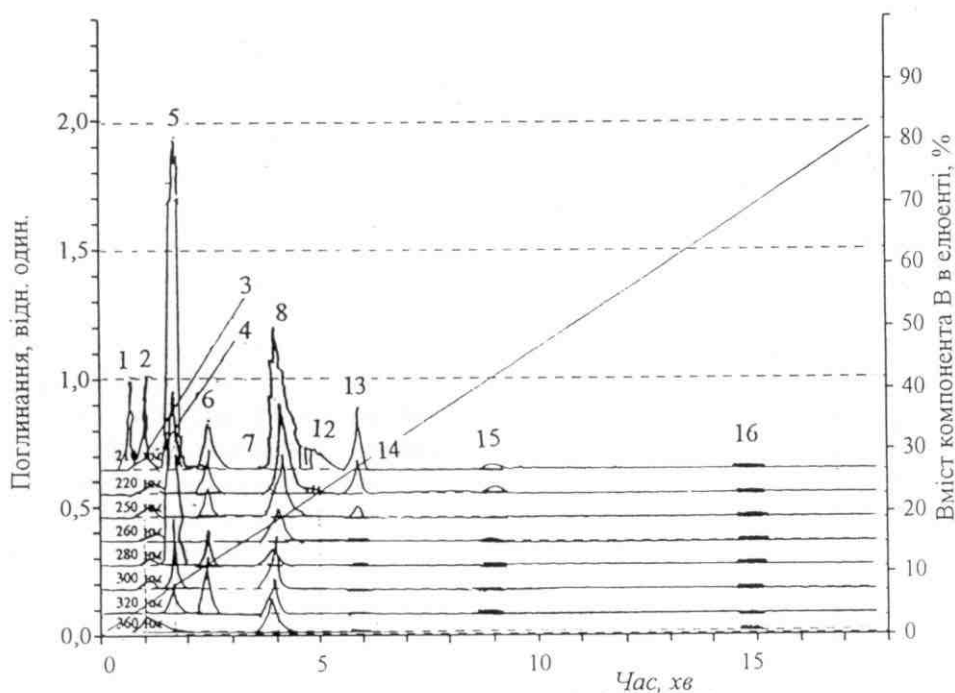


Рис. 3. Хроматограма проби з реакційної суміші через 30 хв після початку другої стадії синтезу

Як видно з рисунків 2 та 3, на початку реакції у реакційній суміші присутні понад 18 різних речовин, кількість яких з часом зменшується (до 16 – за 30 хв та до 12 – за 1 год), що свідчить про перетворення напівпродуктів до основної речовини № 1. Але, як видно з хроматограм, процеси, що йдуть при синтезі Гаммавіру, значно складніші за ті, що попередньо прогнозувалися, а кількість проміжних продуктів значно більша. Особливо слід звернути увагу на піки 8–12 на обох хроматограмах. Фактично можна зробити висновок, що це п'ять ізомерів однієї речовини з однаковими масами та структурою, але з різним положенням радикалів. Також слід відкинути напівпродукти, що не мають ароматики (кільця піразину) та не поглинаються при 280 нм: це речовини із смуг 12–16. Як і було прогнозовано, на хроматограмі присутні сім піків поглинання ароматичних груп при 280 нм: це піки 2, 5, 6, 8, 9, 10 та 11. Всі ці речовини мають близькі молекулярні маси та схожі структури, а речовини із смуг 8–12 зовсім не розділяються та утворюють так зване “плато ізомерів”.

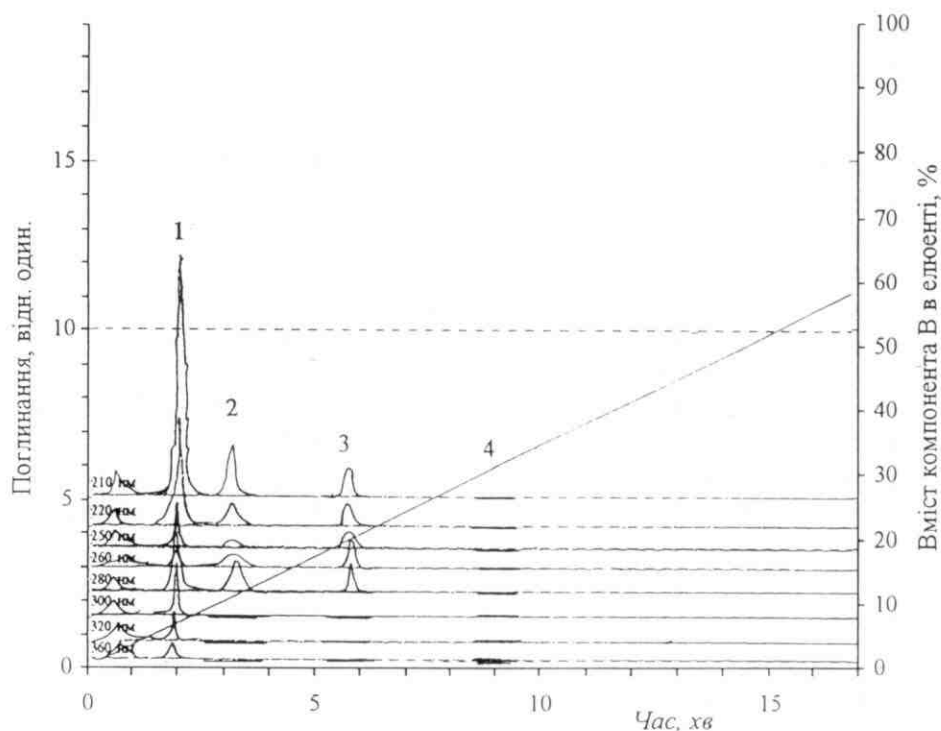


Рис. 4. Хроматограма проби з реакційної суміші після закінчення першої стадії синтезу Гаммавіру

При аналізі реактивної маси, одержаної на першому етапі синтезу (одержання речовини II) на хроматограмі (рис. 4), спостерігаються всього чотири піки, перші три з яких (1, 2 та 3) відповідають ізомерам сполуки II, а четвертий (4) – домішками розчинника, що повністю узгоджується з прогнозами.

Висновки

Таким чином, можна вважати доцільним використання рідинної хроматографії при розробленні технології промислового синтезу лікарських субстанцій, контролю проміжних стадій синтезу, аналізу чистоти та якості синтезованих речовин. Субстанція препарату Гаммавір відповідає умовам фармакопейної статті та, хоч і містить домішки, але у допустимих межах. При дослідженні етапів синтезу Гаммавіру було встановлено, що механізм синтезу значно складніший за той, що був спочатку запропонований: у реакційній суміші через 10 хв після початку реакції присутні понад 18 проміжних речовин, які зникають протягом синтезу Гаммавіру.

Резюме

У роботі представлені результати використання рідинної хроматографії високого тиску для контролю якості субстанції та етапів і динаміки синтезу противірусного препарату Гаммавір, що представляє собою трициклічну речовину та має багато ізомерів. Досліджувалися динаміка синтезу проміжного та кінцевого продукту та наявність домішок у кінцевому продукті. Показано, що синтез проміжної речовини – діглюкопіранозил-піридазину відповідає зпрогнозованій схемі, тобто у суміші присутні три окремі речовини, які є неконденсованими напівпродуктами реакції.

Встановлено доцільність використання рідинної хроматографії при розробленні технології промислового синтезу лікарських субстанцій, контролю проміжних стадій синтезу, аналізу чистоти та якості синтезованих речовин, особливо субстанцій речовин, що містять декілька ізомерів та напівпродуктів синтезу.

Список літератури

1. *Glidden P. F., Goldberg D. B., Heldebrant C. M.* A chromatographic method for the quantification of prostaglandin E(1) and prostaglandin A(1) encapsulated in an intravenous lipid formulation. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2002. – Vol. 28, N 2. – P. 295–302.
2. *Li P., Shaw B. R.* Synthesis of prodrug candidates: conjugates of amino acid with nucleoside boranophosphate. // *Org. Lett.* – 2002. – Vol. 4, N 12. – P. 2009–2012.

3. *Glidden P. F., Goldberg D. B., Heldebrant C. M.* A chromatographic method for the quantification of prostaglandin E(1) and prostaglandin A(1) encapsulated in an intravenous lipid formulation.// J. Pharm. Biomed. Anal.–2002.– Vol. 28, N 2. – P. 295–302.
4. *Lin Z., Neamati N., Zhao H., et al.* Chicoric acid analogues as HIV–1 integrase inhibitors.// J. Med. Chem.– 1999.– Vol. 42.– P. 1401–1414.
5. *Dias C. S., Anand B. S., Mitra A. K.* Effect of mono– and di–acylation on the ocular disposition of ganciclovir: physicochemical properties, ocular bioreversion, and antiviral activity of short chain ester prodrugs.// J. Pharm. Sci.– 2002.– Vol. 91, N 3. – P. 660–668.

61164 м. Харків,
просп. Леніна 47, ФТІНТ НАНУ,
НПВ "Аналітика",
тел. 8 (0572) 19-52-57,
E-mail: analytica@analytica.com.ua

Получено
22.11.2002.