ДОСЛІДЖЕННЯ ДІАЗИНОНУ В МОДЕЛЬНИХ ПРЕПАРАТАХ НА ОСНОВІ МЕТАНОЛУ ТА ІЗОПРОПАНОЛУ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ (ВЕРХ)

*О. В. Коробова, канд. біол. наук,
Л. К. Самарська, старший науковий співробітник,
С. Л. Гуменюк, старший науковий співробітник,
М. І. Березюк, молодший науковий співробітник,
Л. І. Полюжсин, молодший науковий співробітник,
В. І. Ткаченко, канд. біол. наук,
О. М. Душина, старший лаборант з в/о*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок,
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна
okorobova@gmail.com

Метою роботи було дослідити стабільність діазинону в двох модельних сумішах, в яких вміст діючої речовини становить 10 %. Як основу для виготовлення модельних розчинів з діазиноном використовували спирти метиловий та ізопропіловий. За рецептурою модельних препаратів спирти метиловий або ізопропіловий складають близько половини від вмісту компонентів препаратів.

Вміст діазинону визначали методом обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на 3, 14 та 21 день зберігання для модельної суміші із спиртом метиловим та 14 і 50 день для суміші із спиртом ізопропіловим.

Вивченню деградації діазинону та інших неспецифічних фосфорорганічних пестицидів під впливом різних чинників присвячена значна кількість публікацій. Проте, залишається актуальним вивчення цього процесу у сумішах певного складу, зокрема у нових ветеринарних препаратах на стадії розробки. У цій статті представлено порівняння результатів визначення вмісту діазинону у модельних сумішах на основі метилового та ізопропілового спиртів.

Аналізи виконували на рідинному хроматографі фірми Knauer із спектрофотометричним детектором, оснащеному колонкою Luna® Omega Polar C 18 150 × 4,6 мм, заповненою сорбентом із розміром частинок 5 мкм фірми Phenomenex із універсальною C 18 захисною колонкою, розміром 4 × 3,0 мм ID. Рухома фаза: дегазована суміш ацетонітрил : вода у співвідношенні 65 : 35, швидкість потоку 1,1 мл/хв. за температури колонки 20 °С, детектування за довжини хвилі 245 нм, об'єм ін'єкції – 0,050 мл, час одного розділення – 20 хвилин.

Встановлено, що вміст діазинону вже на 21-й день зберігання модельної суміші на основі спирту метилового складає близько 30 % від внесеного, тоді як на 50-й день зберігання модельної суміші на основі спирту ізопропілового - 97 %.

Як виявлено нами у попередніх дослідженнях, використання спирту метилового є ймовірним чинником розпаду діазинону у препараті. Відзначено появу піку одного з продуктів розпаду діазинону на 3 хв хроматограми розчинів виробничого експериментального препарату та модельної суміші, виготовленої у лабораторії ВЕРХ із розчинником метанолом. При заміні метанолу на ізопропанол, на хроматограмі розчину препарату не відзначали появи додаткового піку, окрім піку, що ідентифікується як діазинон. Застосування спирту

ізопропілового не спричиняє зменшення концентрації діазинону у модельній суміші, як у випадку використання метанолу. Композиція із спиртом ізопропіловим забезпечує відносну стабільність модельної суміші.

Ключові слова: ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ДІАЗИНОН, МЕТАНОЛ, ІЗОПРОПАНОЛ, МОДЕЛЬНА СУМІШ, ПРЕПАРАТ, ДЕГРАДАЦІЯ.

STUDY OF DIAZINONE IN MODEL PREPARATIONS BASED ON METHANOL AND ISOPROPANOL BY HIGHLY EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

*O. V. Korobova, L. K. Samarska, S. L. Humenjuk, M. I. Bereziyk, L. I. Poliuzhyn,
V. I. Tkachenko, O. M. Dushna*

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine
okorobova@gmail.com

The aim of the study was to investigate the stability of diazinon in two model mixtures in which the active substance content is 10%. Methyl and isopropyl alcohols were used as a basis for the production of model solutions with diazinon. According to the recipe of model drugs, methyl or isopropyl alcohols make up about half of the content of drug components.

The diazinon content was determined by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) on 3, 14 and 21 days for the model mixture with methyl alcohol and on 14 and 50 days for the mixture with isopropyl alcohol.

A significant number of publications have been devoted to the study of the degradation of diazinon and other nonspecific organophosphorus pesticides under the influence of various factors. However, it remains relevant to study this process in mixtures of a certain composition, in particular in new veterinary drugs under development. This article presents a comparison of the results of determination the content of diazinon in model mixtures based on methyl and isopropyl alcohols.

The analyzes were performed on a Knauer liquid chromatograph with a spectrophotometric detector equipped with a Luna® Omega Polar C 18 150 × 4.6 mm column filled with a 5 μm sorbent of Phenomenex particle size with a 4 × 3.0 mm universal C 18 protective column. Mobile phase: degassed mixture of acetonitrile: water in the ratio 65:35, flow rate 1.1 ml / min at a column temperature of 20 °C, detection at a wavelength of 245 nm, injection volume - 0.050 ml, time of one separation - 20 minutes.

It was found that the content of diazinon on the 21st day of storage of the model mixture based on methyl alcohol is about 30 % of the applied, while on the 50th day of storage of the model mixture based on isopropyl alcohol – 97 %.

As we found in previous studies, the use of methyl alcohol is a probable factor in the breakdown of diazinon in the drug. The appearance of the peak of one of the products of diazinon for 3 min of the chromatogram of solutions of the production experimental preparation and the model mixture made in the HPLC laboratory with the solvent methanol was noted. When replacing methanol with isopropanol, the chromatogram of the drug solution did not show the appearance of an additional peak, except for the peak identified as diazinon. The use of isopropyl alcohol does not reduce the concentration of diazinon in the model mixture, as in the case of methanol. The composition with isopropyl alcohol provides relative stability of the model mixture.

Keywords: HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, DIAZINON, EXPERIMENTAL PREPARATION, MODEL SOLUTIONS, DEGRADATION.

Більш як 50 років у боротьбі із різними шкідниками широко застосовуються пестициди. Пестициди (від лат. *pestis* – зараза, *caedo* – вбиваю) – речовини, які використовуються в

сільському господарстві, для контролю за розмноженням та попередженням появи шкідників (шкідливими або небажаними мікроорганізмами, рослинами і тваринами).

Діазинон – фосфорорганічний інсектоцид та нематоцид із контактною, шлунковою та дихальною дією. Вперше зареєстрований у США в 1956 році і до сьогодні продається під різними торговими марками.

В останні десятиліття у зв'язку із появою на ринку нових, значно ефективніших пестицидів із інсектицидними, акарицидними та нематоцидними властивостями застосування діазинону в основному поширюється на непродуктивних тварин. При застосуванні крапель із вмістом діазинону для домашніх улюбленців – котів та собак показано, що цей інсектицид добре виконує поставлене завдання (Danko et al., 2019).

Протипаразитарні засоби на основі діазинону мають кілька важливих характеристик:

- знищують кліщів та бліх на всіх стадіях розвитку паразитів;
- прості у застосуванні;
- залишки речовини швидко виводяться із організму;
- краплі на основі діазинону мають відносно низьку вартість.

Для наступної реєстрації та легальної реалізації на ринку, важливо було дослідити стабільність діазинону у модельних сумішах, виготовлених із використанням спиртів метилового та ізопропілового в якості розчинників.

Фармацевтичні компанії України створюють нові композиції із діазиноном. На ринку ветпрепаратів України засоби із вмістом діазинону є дозволені, мають реєстраційні посвідчення та є у вільному продажі у ветаптеках і доступні через інтернет (онлайн) – замовлення. Актуальним залишається контроль їх якості, насамперед на етапах розробки рецептур.

Аналіз діазинону, зазвичай, виконують методом рідинної хроматографії із спектрофотометричним детектуванням (Hassanshahian, 2016). Застосовують також спектрофотометрію та інші методи (Ehrampoush et al., 2017).

У цій роботі ми визначали ідентичність і кількісний вміст діазинону на 3, 14 і 21-й дні зберігання за температури 20 °С модельної суміші на основі спирту метилового і на 14 і 50 дні – на основі спирту ізопропілового. За хімічною природою метанол та ізопропанол є спиртами, але за розташуванням у молекулах гідроксильної групи (-ОН групи) відносяться до первинних та вторинних спиртів відповідно (рис. 1). Таке розташування функціональної групи зумовлює різні хімічні властивості цих речовин. Зокрема, це важливо враховувати у випадку, коли метанол та ізопропанол застосовують як розчинники у технології рідких фармацевтичних препаратів.

Рис. 1. Структурні формули метанолу (а) та ізопропанолу (b).

Матеріали і методи. Дослідження проводили в лабораторії високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.

У роботі використовували сертифіковані стандартні зразки діазинону (CAS Number 333-41-5) та «Diazinon 95 % Tech», ацетонітрил (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich), спирт метиловий (HPLC super gradient grade, Makron), спирт ізопропіловий (HPLC, Sigma-Aldrich), воду деіонізовану. Модельні суміші 10 %-го діазинону готувались згідно з рецептурою замовника із спирту метилового (чда, Нідерланди), спирту ізопропілового (HPLC,

Нідерланди), поліетиленгліколю низькомолекулярного (згідно з ТУ 20.16.40-007-71150986-2019), синтанолу АЛМ-10 (згідно з ТУ 2483-063-71150986-2006), ароматизатора CFB 57312 (згідно з ТУ 24.5-3161 3817-006-2004).

Визначання концентрації діазинону здійснювали на рідинному хроматографі фірми Knauer із спектрофотометричним детектором, оснащеному колонкою Luna® Omega Polar C 18 150 × 4,6 мм, заповненою сорбентом із розміром частинок 5 мкм фірми Phenomenex із універсальним захисним картриджем C 18, розміром 4 × 3,0 мм ID перед колонкою. Рухома фаза: дегазована суміш ацетонітрил : вода у співвідношенні 65 : 35, швидкість потоку 1,1 мл/хв. за температури колонки 20 °С, детектування за довжини хвилі 245 нм, об'єм ін'єкції – 0,050 мл.

Додаткове обладнання: ультразвукова баня УЗУ-01, ваги аналітичні AXIS ANG220C 2 класу точності. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2010.

Модельні суміші готували згідно з наданою замовником досліджень послідовністю зважування та змішування компонентів: до зазначеної частини спирту метилового (МС-метанол) чи ізопропілового (МС-ізопропанол) додавали послідовно поліетиленгліколь 400, синтанол, ароматизатор, діючу речовину діазинон, потім додавали відповідний спирт до заданої кінцевої ваги розчину. Після ретельного змішування компонентів моделей суміші піддавали дії ультразвуку впродовж 5 хв. Сертифікований стандартний зразок діазинону та досліджувані суміші розводили до кінцевої концентрації діазинону 100 мкг/мл.

Аналіз проводили згідно з робочою інструкцією лабораторії ВЕРХ РІ 7.2-029/х/2020 «Визначання вмісту діазинону у субстанціях та ветпрепаратах методом ВЕРХ». Інструкція розроблена на основі Державної Фармакопеї України 2.0 (DFU 2.0, 2015) та встановлює визначання вмісту діазинону у субстанціях та ветпрепаратах методом вискоєфективної рідинної хроматографії з УФ-детектуванням (ВЕРХ/УФ). Робоча інструкція розроблена з метою забезпечення виконання вимог DSTU ISO/IEC 17025:2017 п. 7.2 «Вибирання, верифікація та валідація методів».

Результати й обговорення. Інформація про виявлені невідповідності щодо вмісту діазинону в експериментальних препаратах та появу додаткового піку на 3 хв представлена у попередніх дослідженнях (Korobova et al., 2021). Авторами показано, що як у виготовлених на виробництві, так і в лабораторних умовах сумішах 10 % діазинону із розчинником спиртом метиловим через 21 день після виготовлення спостерігається зменшення вмісту діазинону – до 34 % від заявленого та до 21 %, відповідно.

При дослідженні вмісту діазинону у модельних сумішах на різних термінах їх зберігання вивчення хімічної взаємодії між розчинником та діючою речовиною нами не формулювалось, як окреме завдання. Відомо, що діазинон за кімнатної температури повністю змішується із ацетоном, метанолом, етанолом, хлороформом, ацетонітрилом, циклогексаном, дихлорметаном, гексаном, бензолом та петролейним ефіром. Однак, досліджень щодо впливу розчинників на стабільність діазинону не проводилось. Не менш важливим для стабільності діючої речовини є підбір допоміжних речовин, які можуть впливати на стійкість діючої речовини у препараті. Якість лікарського засобу регулюється багатьма факторами під час етапів обробки, пов'язаних з формуванням, заповненням та завершенням операцій. Умови технологічного процесу, а також різні поверхні, з якими контактує лікарський засіб, можуть мати прямий чи опосередкований вплив на цілісність продукту. Навіть короткотривале зберігання, транспортування препарату – модельної суміші із спиртом метиловим, виготовленої на виробництві, може включати наявність несприятливих ситуацій: надто низькі чи високі температури та інші логістичні чинники. Власне таким чином можна обґрунтувати виявлені втрати діючої речовини (34 % та 21 % діазинону від заявленого у виробничій та лабораторній модельній суміші, відповідно).

У дослідженнях по вивченню впливу умов зберігання на стабільність препаратів із діазиноном (Radwan, 2010) спостерігали появу продуктів розпаду діазинону, які ідентифікували як: 1, 3, 5-триметил бензен; 2-метилнафтален; 1-метилнафтален та тріазофос.

Нами було виявлено прогресуюче в часі зменшення вмісту діазинону та поява невідомого піку на 3 хв на хроматограмі досліджуваної модельної суміші на основі спирту метилового. Було зроблено припущення, що невідомий пік відповідає певному продукту розпаду діазинону, оскільки зростання площі цього піку корелюється із зменшенням площі піку діазинону.

У дослідженнях вже через три дні зберігання лабораторної модельної суміші 10 % діазинону із розчинником метанолом спостерігали появу додаткового піку на 3-ій хвилині хроматограми (рис. 2). Статистично обчислений вміст діазинону складав 83 % від внесеного. Було зроблено припущення, що спирт метиловий, ймовірно, є чинником розпаду діазинону.

Рис. 2. Хроматограми розчинів стандартного зразка діазинону (а) та МС-метанол (b), через три дні після приготування

Зменшення площі піку діазинону супроводжувалось зростанням площі піку продукту деградації. Через двадцять один день зберігання (МС-метанол) виявили лише – 21 % діазинону та спостерігали виразне збільшення піку невідомої речовини (рис. 3).

Рис. 3. Хроматограми розчинів стандартного зразка діазинону (а) та МС-метанол, через 21 день після виготовлення (b)

Результати проведених досліджень експериментальних сумішей 10 % діазинону показали недоцільність використання спирту метилового для виготовлення препаратів із вмістом діазинону. Виробник отримав рекомендації щодо застосування спирту метилового як розчинника діазинону для 10 % препарату.

Після виявленої деградації діазинону у модельній суміші із метанолом було вирішено дослідити можливість застосування іншого розчинника. Для виготовлення модельної суміші було обрано спирт ізопропіловий.

У наших дослідженнях виявлено, що для збереження вмісту діазинону в модельній суміші значно ефективнішим виявився спирт ізопропіловий. Через 14 днів зберігання суміші (МС-ізопропанол) на хроматограмі не спостерігали появи додаткових (інших) піків, окрім діазинону, зокрема на третій хвилині хроматограми. Статистично обчислений вміст діазинону складав 97 % від внесеного (рис. 4).

Рис. 4. Хроматограми розчинів стандартного зразка діазинону (а) та МС-ізопропанол (б), через 14 днів після приготування

Через 50 днів зберігання (МС-ізопропанол) виявляли діазинону 93 % від внесеного, а появи піку продукту розпаду(хімічних перетворень) діазинону на хроматограмі розчину не спостерігалась (рис. 5).

Рис. 5. Хроматограми розчинів стандартного зразка діазинону (а) та МС- ізопропанол (б), через 50 днів після приготування

На рис. 6 представлено об'єднаний графік для (МС-метанол) та (МС-ізопропанол), що відображає стрімке падіння вмісту діазинону в суміші на основі спирту метилового та стабільність цього показника за використання у якості розчинника ізопропанолу.

Рис. 6. Об'єднаний графік для (МС-метанол) та (МС-ізопропанол)

Виявлена кількість діазинону в (МС-ізопропанол) є в межах допустимої норми $\pm 10\%$.

Незначні втрати вмісту діазинону у (МС-ізопропанол) можна пов'язати із похибкою аналізу, або із якістю використаного для моделі ізопропанолу. Можливо доцільно перевіряти якість кожної придбаної серії розчинника ізопропанолу перед використанням його згідно рецептури. Значний попит на ізопропанол у зв'язку з виготовленням побутових дезінфектантів може спричиняти появу на ринку неякісних партій цього розчинника.

ВИСНОВКИ

При дослідженні модельної суміші діазинону 10 % на 21-ий день зберігання (МС – метанол) спостерігали зменшення вмісту діазинону до 21 % від заявленого та появу додаткового компоненту в суміші. Через 50 днів зберігання (МС-ізопропанол) виявляли діазинону 93 % від внесеного. Виробник отримав рекомендації щодо недоцільності застосування спирту метилового, як розчинника діазинону для 10 % препарату. Спирт ізопропіловий рекомендований у якості більш перспективного розчинника, відповідного завданню збереження вмісту діазинону у майбутніх препаратах. Вивчення стабільності діючих речовин є дуже важливим етапом розробки ветеринарних препаратів та визначає ефективність і безпечність лікарського засобу.

Перспективи досліджень. Наступним етапом роботи із розчинами діазинону будуть довготривалі спостереження за якісним складом та кількісним вмістом діючої речовини протягом планованого виробником терміну придатності.

References

- Ahmadi, A. Nahri-Niknafs, B. (2011). Photodegradation of insecticide diazinon under simulated solar light irradiation conditions and identification of photoproducts. Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara). 56(70), 2: 67-70.
- Colović, M., Krstić, D., Petrović, S., Leskovac, A., Joksić, G., Savić, J., Franko, M., Trebse, P., Vasić, V. (2009). Toxic effects of diazinon and its photodegradation products. Toxicology Letters. 193(1), 9-18. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.11.022.
- Danko, M.M., Tishyn, O.L., Perih, Zh.M., Khomiak, R.V. (2019). Porivnialna otsinka preparativ na osnovi propoksuru ta diazynonu za invazii sobak i kotiv klishchamy Dermacentor reticulatus. NTB IBT i DNDKI vetpreparativ ta kormovykh dobavok. 20. 2. 76-80. [in Ukrainian]. doi.org/10.36359/scivp.2019-20-2.36.

Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. (2015). Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr» Kharkiv: RIREH. 1. 86-88. [in Ukrainian].

DSTU ISO/IEC 17025:2017 «Zahalni vymohy do kompetentnosti vyprobuvalnykh ta kalibruvalnykh laboratorii». [in Ukrainian].

Ehrampoush, M.H., Sadeghi, A., Ghaneian, M.T., Bonyadi, Z. (2017). Optimization of diazinon biodegradation from aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *AMB Express*, 7(1): 1-6 doi:10.1186/s13568-017-0366-5.

Hassanshahian, M. (2016). Isolation and Characterization of Diazinon Degrading Bacteria from Contaminated Agriculture Soils. *IJT*. 10 (4):13-20.

Radwan, O.R. 2010 Effect of storage condition on the stability of physicochemical and properties of diazinon insecticide formulation and its residue in *Oreochromis niloticus*. *Egypt. J. Agric. Res.* 88(2): 495-506.