

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ НОВЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ ИЗ ГРУППЫ ТИАДИАЗОЛИЛАМИДОВ

М.А. Демидова

д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармации, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России

Н.С. Попов

ассистент, кафедра фармации, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России

E-mail: ns.popov@mail.ru

А.С. Малыгин

ординатор, кафедра фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России

E-mail: education@tvgtmu.ru

Разработана методика высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) для разделения и идентификации новых противовоспалительных средств из группы тиадiazолилами́дов. Определены значения MRM-переходов для ацексазоламида, нитробензоламида и пиридазоламида.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС, хроматография, масс-спектрометрия, тиадiazолиламид, нестероидные противовоспалительные средства.

Для цитирования: Демидова М.А., Попов Н.С., Малыгин А.С. Применение ВЭЖХ-масс-спектрометрии для разделения и идентификации новых противовоспалительных средств из группы тиадiazолилами́дов. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(4):12–17. DOI: 10.29296/25877313-2018-04-03

Доказана противовоспалительная активность синтезированных соединений из группы НПВП производных тиадiazолилами́да в экспериментах на животных, отличающихся невысокой токсичностью и низкой ульцерогенностью [1–5]. Полученные результаты позволяют рассматривать эти соединения в качестве перспективных лекарственных средств, в процессе создания которых необходимо установление критериев подлинности и разработка методов их количественного определения. Современным методом, позволяющим осуществлять идентификацию различных соединений, является ВЭЖХ-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС). Учитывая высокую точность и специ-

фичность данного метода, его можно использовать для контроля качества лекарственных средств, а также для экспериментальных и клинических фармакокинетических исследований.

Цель исследования – разработка методики ВЭЖХ-МС/МС-метода разделения и идентификации новых противовоспалительных средств из группы тиадiazолилами́дов при их одновременном нахождении в пробе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились новые противовоспалительные средства из группы производных тиадiazолилами́да – ацексазоламид, пиридазоламид и нитробензоламид, синтезированные в ОАО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна) проф. С.Я. Скачиловой, химическая структура которых представлена на рис. 1.

Для идентификации и хроматографического разделения производных тиадiazола использовали метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Хроматографию осуществляли с помощью высокоэффективного жидкостного

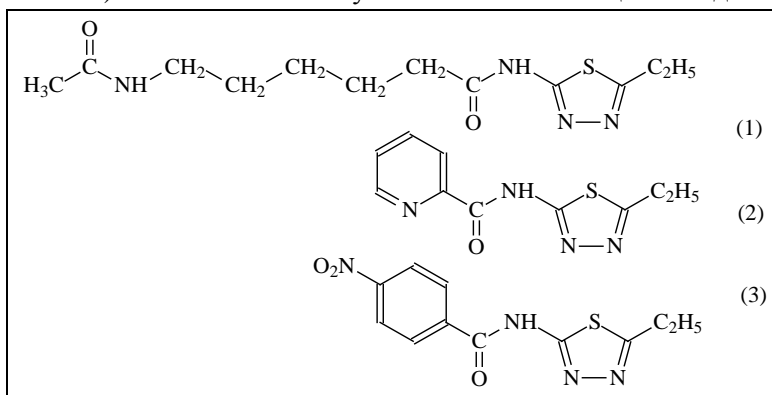


Рис. 1. Химическая структура производных тиадiazолилами́да: ацексазоламида (1), пиридазоламида (2), нитробензоламида (3)

хроматографа Agilent 1260 Infinity II («Agilent Technologies», Германия). В исследовании использовали аналитические колонки: Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,7 мкм 4,6×100 мм; Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 5 мкм 4,6×150 мм. В качестве элюента применяли смеси ацетонитрила, метанола, воды деионизированной и муравьиной кислоты в различных соотношениях. Исследовали влияние режима хроматографирования (изократический и градиентный), состава и скорости потока подвижной фазы с целью определения оптимальных условий разделения исследуемых соединений. Общее время элюирования составило 12 мин. Объем вводимой пробы раствора анализируемых соединений – 10 мкл. На полученных хроматограммах определяли время удерживания тиадиазолиламидов, высоту пика и ширину на половине высоты, коэффициент разделения компонентов пробы.

Детектирование осуществляли масс-спектрометрически с помощью тройного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex QTrap 3200 MD («AB Sciex», Сингапур) с электрораспылительным источником ионов (Turbo V с зондом TurboIonSpray). В качестве программного обеспечения использовали Analyst MD 1.6.2.Software (AB Sciex).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработку методики масс-спектрометрической идентификации исследуемых соединений осу-

ществляли путем прямого ввода образца в масс-детектор с помощью шприцевого насоса. Анализировали смесь стандартных растворов ацексазоламида, пиридазоламида и нитробензоламида (50 нг/мл). В качестве растворителя использовали ацетонитрил и воду деионизированную в соотношении 2:1 с добавлением 0,1% муравьиной кислоты.

Выявлено, что при наличии в пробе нескольких тиадиазолиламидов наибольшая чувствительность была выше в режиме регистрации отрицательных ионов. Для получения устойчивой масс-спектрограммы были подобраны следующие условия детектирования: отрицательная поляризация, напряжение электроспрея – 5500,0 В, потенциал декластеризации ацексазоламида, пиридазоламида и нитробензоламида – соответственно –170,0; –140,5, –280,0 В при давлении газа завесы 1,37 атм и газа распыления 2,75 атм и скорости 10 мкл/мин. Потенциал ввода для всех ионов составил –4,5 В, диапазон сканирования 200–300 Да.

Анализ полученного масс-спектра на первом аналитическом квадруполе Q1 показал, что в данных условиях образуются депротонированные молекулы исследуемых соединений $[M-H]^-$ со значением m/z 232,9 Да (пиридазоламид), 276,9 Да (нитробензоламид) и 282,8 Да (ацексазоламид) (рис. 2.)

Для точной идентификации анализируемых соединений были определены соответствующие

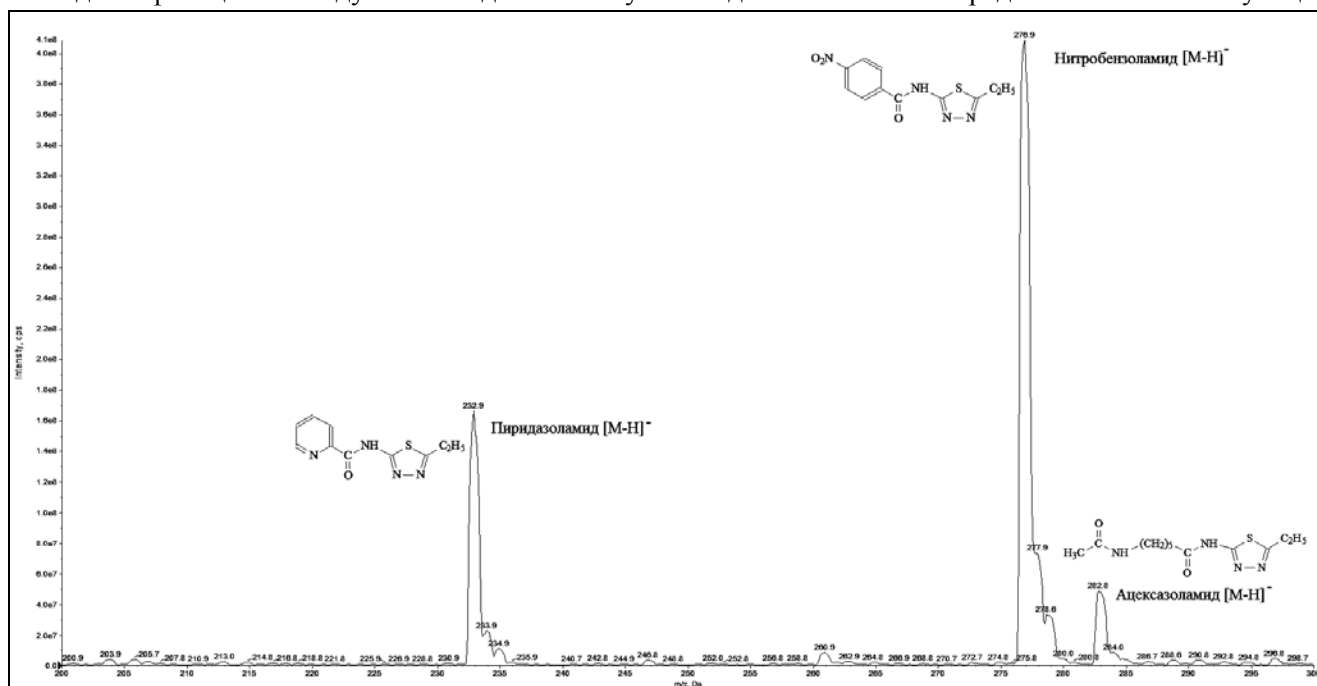


Рис. 2. Масс-спектр депротонированных пиридазоламида, нитробензоламида, ацексазоламида (в режиме сканирования отрицательных ионов $[M-H]^-$)

MRM-переходы. Для ацексазоламида значения m/z ионов-продуктов составили 73,1, 128 и 196,1 Да; для нитробензоламида – 189,9, 144,2 и 122,1 Да; для пиридазоламида – 146,2, 78,0 и 102,9 Да.

Оптимизацию хроматографического разделения тиадиазолиламида проводили с использованием различных аналитических колонок, составов подвижной фазы и режимов элюирования. Так, при использовании колонки InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,7 мкм 4,6×100 мм с изократическим режимом элюирования смесью ацетонитрила и воды в соотношении 90:10 при скорости потока подвижной фазы 400 мкл/мин в течение 12 мин не наблюдали выхода компонентов пробы из хроматографической колонки. Увеличение расхода элюента до 1 мл/мин при сохранении его состава не привело к достижению выхода анализируемых веществ из колонки за указанное время.

Результаты дальнейших исследований показали, что увеличение содержания ацетонитрила в подвижной фазе до 30% при сохранении скорости подвижной фазы 0,4 мл/мин способствовало выходу всех трех анализируемых соединений в течение 12 мин. Однако анализ хроматограммы показал, что при таких условиях ацексазоламид и пиридазоламид элюируются одним пиком в середине 2 мин, а время удерживания нитробензоламида со-

ставляет 9,5 мин, что делает данный метод сравнительно длительным с большим расходом подвижной фазы и непригодным для разделения всех компонентов пробы.

Увеличение скорости подачи при сохранении состава элюента приводило лишь к незначительному уменьшению времени удерживания исследуемых соединений; разделения ацексазоламида и пиридазоламида при этом достичь не удалось. Применение метанола вместо ацетонитрила в тех же условиях приводило к увеличению времени удерживания анализируемых веществ, а также к сильному размытию пиков, что исключило использование метанола в последующих экспериментах.

Дальнейшие исследования проводили в градиентном режиме элюирования: первые 2 мин в колонку подавался 10%-ный водный раствор ацетонитрила, с 3-й по 6-ю мин происходило увеличение содержания ацетонитрила в подвижной фазе до 70%, с 7-й по 12-ю мин – 10%-ный водный раствор ацетонитрила. При этом скорость подвижной фазы составила 0,6 мл/мин.

Анализ результатов хроматографического разделения показал, что применение градиентного режима приводит к уменьшению времени удерживания нитробензоламида до 7,8 мин и к частичному разделению пиков ацексазоламида и пиридазо-

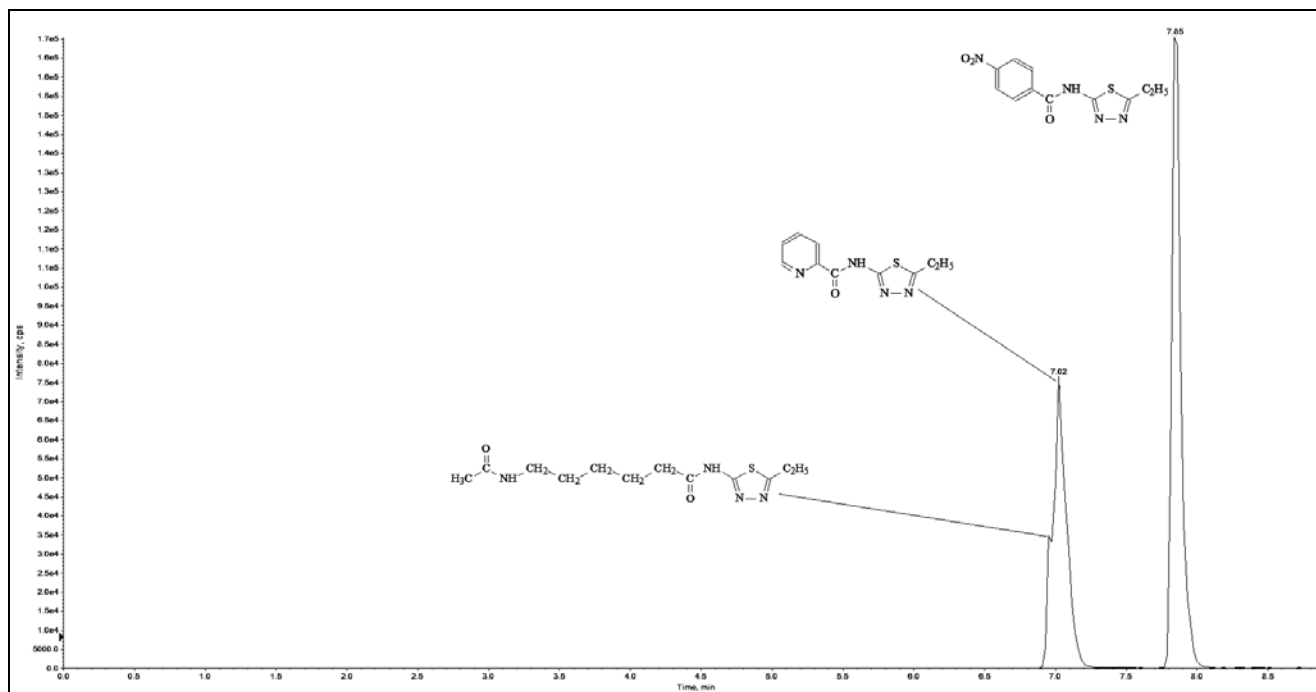


Рис. 3. Полная ионная хроматограмма смеси тиадиазолиламида (колонка InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,7 мкм 4,6×100 мм, градиентное элюирование: 1–2 мин 10%-ного ацетонитрила, 3–6 мин увеличение содержания ацетонитрила до 70%, 7–12 мин 10%-ного ацетонитрила, скорость потока 0,6 мл/мин)

ламида с удлинением времени удерживания до 6,96 и 7,03 мин соответственно. Однако коэффициент разделения критической пары составил 1,01, что также делает этот метод непригодным для

разделения многокомпонентных смесей тиадиазоламидами (рис. 3).

Дальнейшее модифицирование градиентного режима элюирования позволило незначительно

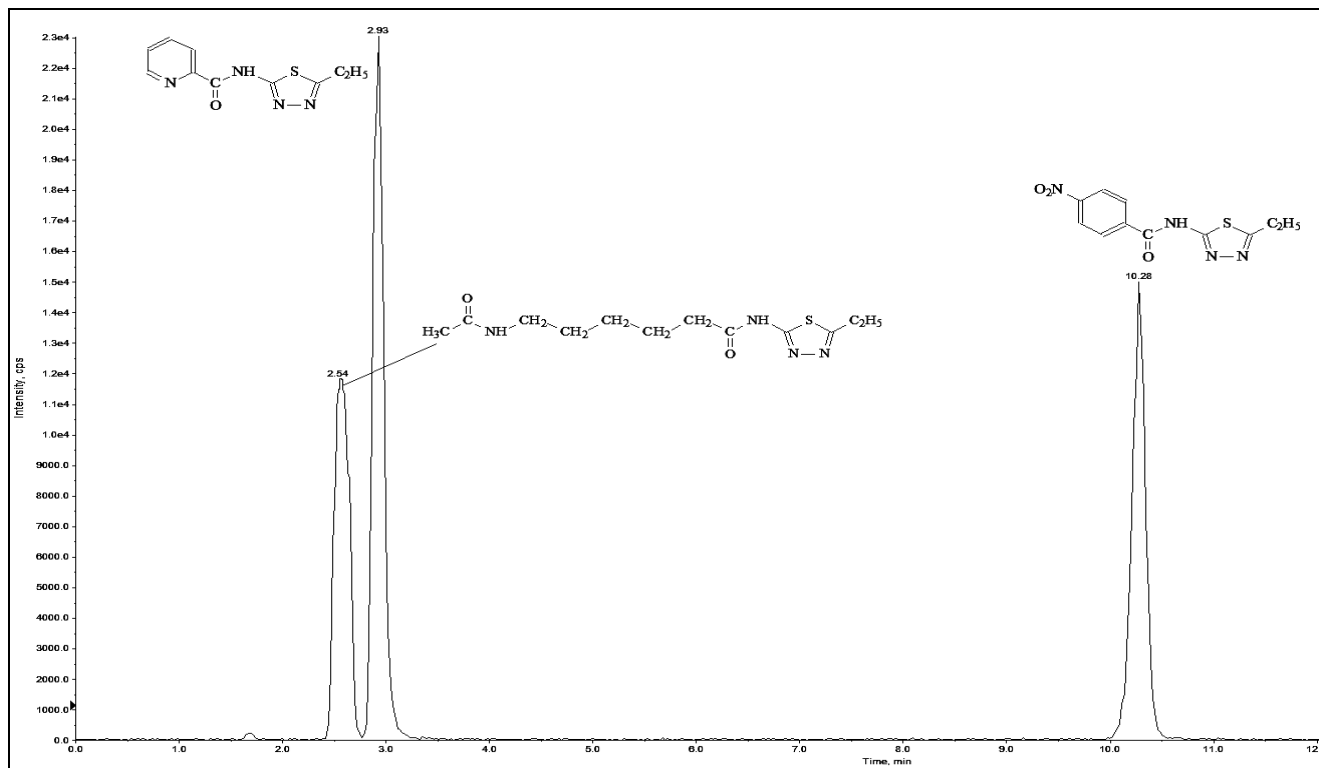


Рис. 4. Полная ионная хроматограмма смеси тиадиазоламидами (колонка Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 5мкм 4,6×150 мм, изократическое элюирование 30% ацетонитрила, скорость потока 0,4 мл/мин)

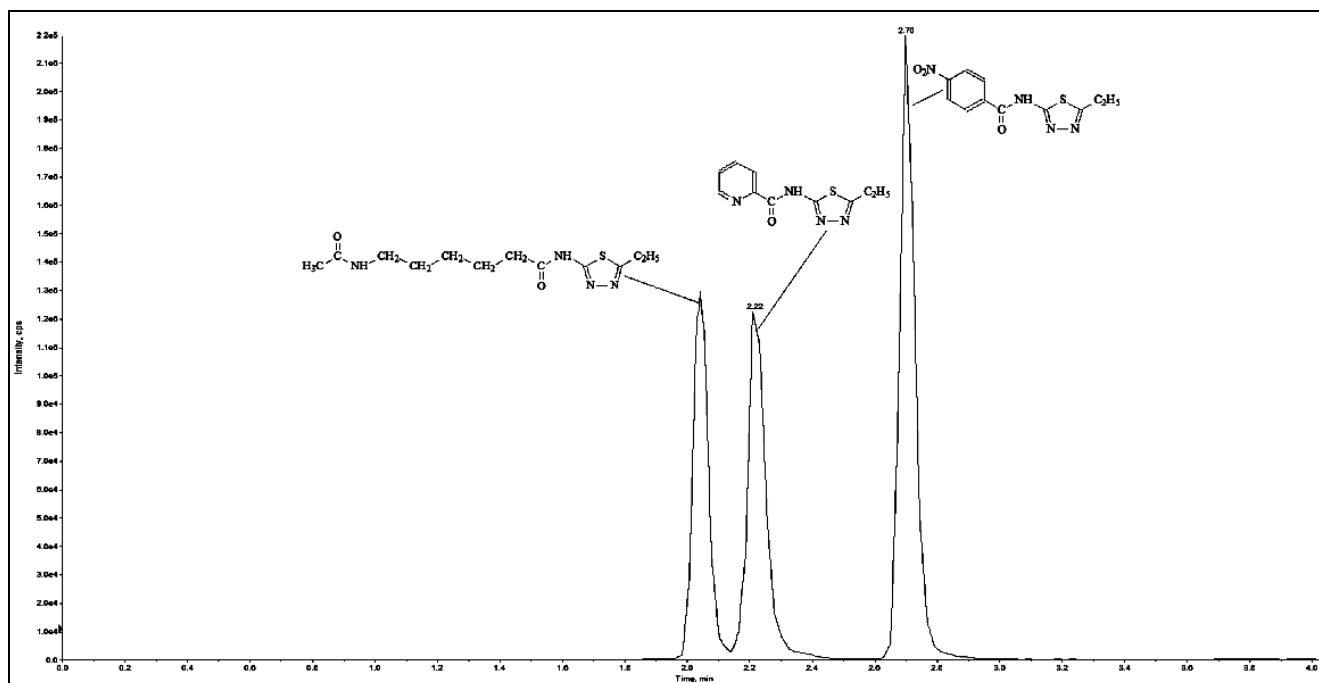


Рис. 5. Полная ионная хроматограмма смеси тиадиазоламидами (колонка Zorbax Eclipse Plus C18 5 мкм 4,6×150 мм, ступенчатое градиентное элюирование: 1–2,5 мин 30% ацетонитрила, 0,6 мл/мин; 2,5–12 мин 70% ацетонитрила, 1,2 мл/мин)

сократить время удерживания исследуемых соединений, однако полного разделения компонентов пробы достичь не удалось. Поэтому дальнейшие исследования были выполнены с использованием хроматографической колонки Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 5 мкм 4,6×150 мм. Применение данной колонки позволило удовлетворительно разделить смесь тиадиазолиламидов в изократическом режиме элюирования с использованием 30%-ного водного раствора ацетонитрила при скорости подвижной фазы 0,4 мл/мин (рис. 4).

Коэффициент разделения ацексазоламида и пиридазоламида при этом составил 1,16, что позволяет использовать данный метод для точной идентификации анализируемых соединений. Дальнейшие исследования были направлены на уменьшение продолжительности анализа. С этой целью разработан ступенчатый градиентный режим элюирования с комбинацией двух изократических участков с разной элюирующей силой подвижной фазы. Так, до 2,5 мин (выход ацексазоламида и пиридазоламида из колонки) элюирование проводили 30%-ным водным раствором ацетонитрила со скоростью 0,6 мл/мин; с 2,5-й по 12-ю мин элюирование осуществляли 70%-ным водным раствором ацетонитрила с увеличением расхода элюента до 1,2 мл/мин. Данный режим позволил сократить время разделения компонентов пробы до 3 мин с сохранением селективности (рис 5).

Время удерживания ацексазоламида, пиридазоламида и нитробензоламида составило соответственно 2,05; 2,22 и 2,70 мин. Коэффициент разделения ацексазоламида и пиридазоламида был равен 1,1, а нитробензоламида и пиридазоламида – 1,21, что является достаточным для эффективной и точной идентификации исследуемых соединений.

Высота пиков ацексазоламида, пиридазоламида и нитробензоламида составила соответственно $1,36 \cdot 10^5$; $1,29 \cdot 10^5$; $2,23 \cdot 10^5$ имп/с.

ВЫВОДЫ

Результатом проведенного исследования явилась разработка методики идентификации и разделения новых соединений из группы производных тиадиазолиламида при их одновременном нахождении в пробе с помощью ВЭЖХ-МС/МС: аналитическая колонка Zorbax Eclipse Plus C18 5 мкм 4,6×150 мм, ступенчатое градиентное элюирование: 1–2,5 мин 30% ацетонитрила, 0,6 мл/мин; 2,5–12 мин 70% ацетонитрила, 1,2 мл/мин, продолжительность анализа – 3 мин; масс-спектрометрическое детектирование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Казаишвили Ю.Г., Малыгин А.С., Попов Н.С. Исследование противоаллергической, анальгетической и противовоспалительной активности новых производных тиадиазола // Материалы Междунар. научно-практич. конф. «Наука и образование в XXI веке» (30 сентября 2013, Тамбов). 2013. Т. 1. С. 81–83.
2. Казаишвили Ю.Г., Демидова М.А. Исследование анальгетической активности новых производных тиадиазола // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 6. URL: www.science-education.ru/106-7306.
3. Попов Н.С., Демидова М.А. Оценка острой токсичности нового аминокислотного производного тиадиазола при внутрибрюшинном введении мышам // Верхневолжский медицинский журнал. 2016. Т. 15. Вып. 1. С. 9–12.
4. Попов Н.С., Демидова М.А. Оценка ulcerогенности нового аминокислотного производного тиадиазола при внутрижелудочном введении крысам // Врач-аспирант. 2017. № 1(80). С. 71–78.
5. Arpit K., Basavaraj M., Sarala P., Sujeet K., Satyaprakash K. Synthesis and pharmacological activity of imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole derivatives // Acta Poloniae Pharmaceutica, Drug Research. 2016. V. 73. № 4. P. 937–947.

Поступила 18 октября 2017 г.

LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (HPLS-MS-MS) AS METHOD FOR SEPARATION AND IDENTIFICATION OF NEW ANTI-INFLAMMATORY AGENT FROM DERIVATIVES OF THIADIAZOLILAMIDE

© Authors, 2018

M.A. Demidova

Dr.Sc. (Med.), Professor, Head of Department, Tver State Medical University

N.S. Popov

Assistant, Department of Pharmacy, Tver State Medical University

E-mail: ns.popov@mail.ru

A.S. Malygin

Ordinator, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Tver State Medical University
E-mail: education@tvgrmu.ru

Objective. Development of the HPLC-MS / MS technique for the separation and identification of new anti-inflammatory drugs from the thiadiazolamide group.

Material and methods. Non-steroid anti-inflammatory drugs from the group of thiadiazolamide derivatives – acexazolamide, pyridazolamide and nitrobenzolamide were the objects of this study. Chromatography was performed using an Agilent 1260 Infinity II chromatograph (Agilent InfinityLab Poroshell 120 analytical columns EC-C18 2.7 μ m 4.6 \times 100 mm, Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 5 μ m 4.6 \times 150 mm). As a mobile phase, a mixtures of acetonitrile, methanol, deionized water and formic acid was used in different ratios in isocratic or gradient modes. Identification of new anti-inflammatory agents from the thiadiazolamide group was carried out mass-spectrometrically using a triple quadrupole mass spectrometer AB Sciex QTrap 3200 MD with an electrospray ion source (Turbo V with a TurbolonSpray probe).

Results. a high performance liquid chromatography technique with tandem mass spectrometry (HPLC-MS / MS) was developed to separate and identify new anti-inflammatory agents from the thiadiazolamide group (Zorbax Eclipse Plus C18 analytical column 5 μ m 4.6 \times 150 mm, gradient elution: 1-2 , 5 min 30% acetonitrile, 0.6 ml/min 2.5 - 12 min 70% acetonitrile, 1.2 ml/min, analysis time 3 minutes, mass spectrometric detection). The retention time of acexazolamide, pyridazolamide and nitrobenzolamide was 2.05, 2.22 and 2.70 minutes respectively. The identification of thiadiazolamides was carried out by mass spectrometry. Detection conditions: negative polarization, electrospray voltage - 5500.0 V, decasterization potential of acexazolamide, pyridazolamide and nitrobenzenamide -170,0; -140.5, -280.0 V at a curtain gas pressure of 20.0 psi and a spray gas of 40.0 psi, a rate of 10 μ l/min. The input potential for all ions was -4.5 V, the scan range was 200-300 Da. The values of MRM transitions with negative polarization were for azexazolamide m/z 282.8 \rightarrow 73.1 m/z 282.8 \rightarrow 128 and m /z 282.8 \rightarrow 196.1; for nitrobenzenamide m/z 276.9 \rightarrow 189.9, m/z 276.9 \rightarrow 144.2 and m/z 276.9 \rightarrow 122.1; for pyridazolamide m/z 232.9 \rightarrow 146.2, m/z 232.9 \rightarrow 78.0 and m/z 232.9 \rightarrow 102.9.

Conclusion. The developed HPLC-MS / MS technique allows the detection of new non-steroid anti-inflammatory drugs from the group of thiadiazolamide derivatives in one sample without their separation.

Keywords: HPLS-MS/MS, chromatography, mass-spectrometry, thiadiazolilamides, non-steroid anti-inflammatory drug/

For citation: Demidova M.A., Popov N.S., Malygin A.S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLS-MS-MS) as method for separation and identification of new anti-inflammatory agent from derivatives of thiadiazolilamide. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(2):12–17. DOI: 10.29296/25877313-2018-04-03

REFERENCES

1. Kazaishvili Ju.G., Malygin A.S., Popov N.S. Issledova–nie protivoallergicheskoy, anal'geticheskoy i protivovospali-tel'noy aktivnosti novyh proizvodnyh tiadiazola // Materialy mezhdunar. nauchno-praktich. konf. «Nauka i obrazovanie v XXI veke» (30 sentjabrja 2013, Tambov). 2013. T. 1. S. 81–83.
2. Kazaishvili Ju.G., Demidova M.A. Issledovanie anal'geticheskoy aktivnosti novyh proizvodnyh tiadiazola // Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2012. № 6. URL: www.science-education.ru/106-7306.
3. Popov N.S., Demidova M.A. Ocenka ostroj toksichnosti novogo aminokislotnogo proizvodnogo tiadiazola pri vnutribrjushinnom vvedenii mysham // Verhnevolzhskij medicinskij zhurnal. 2016. T. 15. Vyp. 1. S. 9–12.
4. Popov N.S., Demidova M.A. Ocenka ul'cerogenosti novogo aminokislotnogo proizvodnogo tiadiazola pri vnutrizheludochnom vvedenii krysam // Vrach-aspirant. 2017. № 1(80). S. 71–78.
5. Arpit K., Basavaraj M., Sarala P., Sujeet K., Satyaprakash K. Synthesis and pharmacological activity of imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole derivatives // Acta Poloniae Pharmaceutica, Drug Research. 2016. V. 73. № 4. P. 937–947.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Алпизарин (таблетки, мазь), рег. №№ 85/507/2; 85/507/10; 85/507/16 – противовирусное средство, получаемое из травы ко-пеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.) или копеечника желтеющего (*Hedysarum flavescens* Rerel et Schmalh). По сравнению с ацикловиrom обладает более широким спектром действия.

Аммифурин (таблетки, спиртовой раствор), рег. №№ 83/914/9; 70/151/47; 70/151/48 – фотосенсибилизирующее средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45
Fax: 8(495)712-09-18;
e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru