

ИЗУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ СУК-КИНАЗЫ В УСЛОВИЯХ МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Сенченко С.П.¹, Чилов Г.Г.², Новиков Ф.Н.²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, Россия (357532 Ставропольский край, г.Пятигорск, пр-кт Калинина 11), asp_nauka@mail.ru

²Институт Органической Химии им. Н.Д.Зелинского РАН, Москва, Россия (119991, г.Москва, Ленинский проспект, 47)

Представлены результаты разработки методики анализа новых ингибиторов Сук-киназы (лабораторные шифры MT-Syk-00 и MT-Syk-03), являющиеся производными диаминодиазина и диаминотриазина, методом капиллярного электрофореза в условиях мицеллярной электрокинетической хроматографии. Работа выполнялась на приборе Капель 105 (группа компаний «Люмэкс», Россия). В работе использовался термостатируемый кварцевый капилляр с рабочей длиной 65 см и диаметром 75 мкм. Температура опыта составила 20 °С и напряжение 20 кВ, детектирование осуществляли спектрофотометрически при 254 нм. В результате исследований разделения изучаемых веществ удалось достичь при использовании электролита следующего состава: раствор натрия тетрабората декагидрат с концентрацией 2 мг/мл, добавка додецилсульфата натрия (10 мг/мл) и мочевины (400мг/мл). В этих условиях разрешение пиков составило 2,38.

Ключевые слова: ингибиторы Сук-киназы, капиллярный электрофорез, мицеллярная электрокинетическая хроматография, мочевина.

STUDYING OF ELECTROPHORETIC BEHAVIOUR OF NEW SYK-KINASE INHIBITORS IN THE CONDITIONS OF THE MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Senchenko S.P.¹, Chilov G.G.², Novikov F.N.²

¹Pyatigorsk medico-pharmaceutical institute –branch to Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia (357532 Stavropol region, Pyatigorsk, st. Kalinin 11), asp_nauka@mail.ru

²Institute of Organic Chemistry of N.D.Zelinskogo of the Russian Academy of Sciences Moscow, Russia (Leninsky prospekt, 47, 119991 Moscow, Russia)

The results of analysis of the techniques for new inhibitors of Syk-kinase (laboratory code MT-Syk-00 and MT-Syk-03) that are derivatives diaminodiazina and diaminotriazina, by capillary electrophoresis under micellar electrokinetic chromatography are presents. The work was carried out on the device Capel 105(group of companies "LUMEX", Russia). We used a temperature-controlled quartz capillary with a working length of 65 cm and a diameter of 75 microns. The temperature of experiment was 20 0C and 20 kV voltage, the detection was carried out by spectrophotometry at 254 nm. As a result of studies of separation of the test substances was achieved using the electrolyte of the following composition: sodium tetraborate decahydrate solution at a concentration of 2 mg / ml, the addition of sodium dodecyl sulfate (10 mg/ml) and urea (400mg/ml). Under these conditions, the peak resolution was 2,38.

Keywords: inhibitors Syk-kinase, capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, urea.

В настоящее время при разработке лекарственных средств (ЛС) предназначенных для лечения ревматоидного артрита (РА), а также ряда онкологических заболеваний, все большее внимание уделяется соединениям, действие которых нацелено на протеинкиназы, в частности митоген-активированную фосфокиназу р38 (p38 MAPK), селезеночную тирозинкиназу (Сук) и янус-киназу (ЖАК). Однако, клинические испытания показали достоверную эффективность в лечении РА и некоторых онкологических заболеваний только ингибиторов Сук- и ЖАК-киназ. В частности, можно отметить такие ЛС как фостаматиниб

(ингибитор SYK-киназы) и тофацитиниб (ингибитор JAK-киназы), клинические испытания которых уже показали высокую эффективность в сочетании с удовлетворительной безопасностью [2].

Поэтому, разработка новых ЛС направленных на ингибирование данных видов протеинкиназ является актуальной задачей современной медицины и фармации. Следует также сказать, что разработка новых ЛС требует наличие надежных методов оценки их качества. На сегодняшний день одним из перспективных методов анализа является капиллярный электрофорез, обладающий высокой эффективностью, экспрессностью и экономичностью исследований. Метод уже входит в ведущие мировые фармакопеи, а также активно развивается в отечественной фармацевтической отрасли.

Цель работы: с использованием капиллярного электрофореза разработать методику анализа новых ингибиторов Syk-киназы (шифр МТ-Syk-00 и МТ-Syk-03).

Материалы и методы исследования

В работе использовали фармацевтические субстанции (в виде свободного основания) веществ (табл. 1), представляющие собой производные диаминодиазина и диаминотриазина и являющиеся ингибиторами Syk-киназы (лабораторные шифры МТ-Syk-00 и МТ-Syk-03), для лечения РА и ряда онкологических заболеваний.

Таблица 1

Формулы ингибиторов SYK-киназы МТ-SYK-00 и МТ-SYK-03

Шифр соединения	Структурная формула
МТ-SYK-00	
МТ-SYK-03	

Данные фармацевтические субстанции были предоставлены опытным производством компании ООО «Молекулярные Технологии». В работе использовались субстанции, с содержанием действующих веществ не менее 99,8%

Для определения веществ был использован метод капиллярного электрофореза. Измерения проводились на приборе Капель 105 (группа компаний «Люмэкс», г. Москва). В работе использовался термостатируемый кварцевый капилляр с рабочей длиной 65 см и диаметром 75 мкм. Температура опыта составила 20 °С и напряжение 20 кВ (блок положительной полярности).

Результаты исследования и их обсуждение

Учитывая слабоосновный характер веществ, эксперимент необходимо было проводить в условиях мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) [1]. При этом в качестве ведущего электролита использовали раствор натрия тетрабората декагидрата с концентрацией 2 мг/мл и добавкой додецилсульфата натрия, концентрация которого варьировалась от 10 до 20 мг/мл. Ввод пробы осуществляли гидродинамически 150 мБар•с. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при 254 нм. Для обработки хроматограмм была использована программа «Мультихром».

В результате было показано, что оба вещества мигрируют в одно и то же время, при этом увеличение концентрации додецилсульфата натрия до 20 мг/мл не приводило к улучшению разделения. Полученная в данных условиях электрофореграмма представлена на рисунке 1.

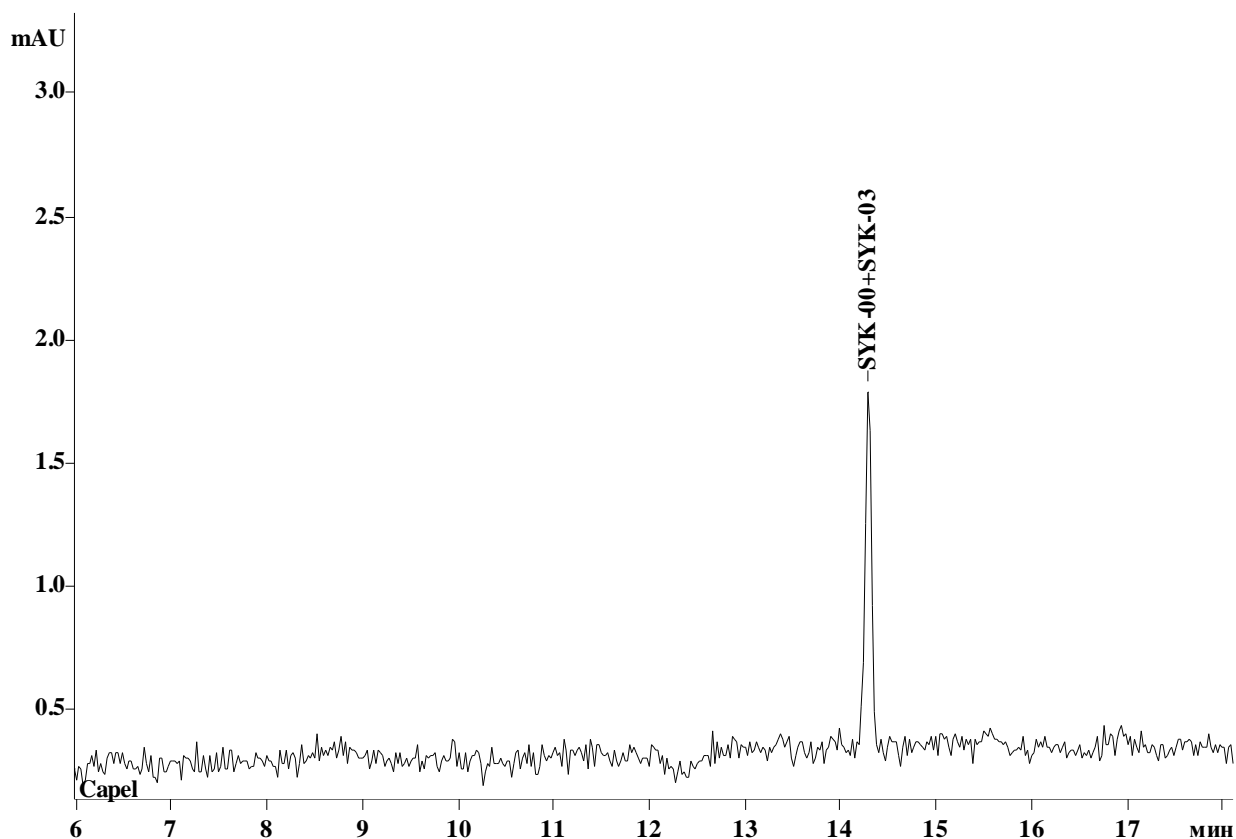


Рис. 1. Электрофореграмма модельной смеси МТ-SYK-00 и МТ-SYK-03 в условиях МЭКХ (концентрация додецилсульфата натрия 20 мг/мл)

Данный факт можно объяснить близкими значениями их гидрофобности, в результате чего константа их распределения между мицеллярной (псевдостационарной) фазой и фазой раствора одинакова.

В ряде случаев для повышения степени разделения компонентов в МЭКХ используют добавку метанола к ведущему электролиту. В этом случае удастся повлиять на гидрофобные взаимодействия между анализируемым компонентом и мицеллой, а также на подвижность электроосмотического потока и собственную электрофоретическую подвижность аналита и соответственно повысить селективность анализа [3,5]. Поэтому, на следующем этапе работы осуществляли добавку метанола, содержание которого в ведущем электролите составило 10%. Результаты представлены на рисунке 2.

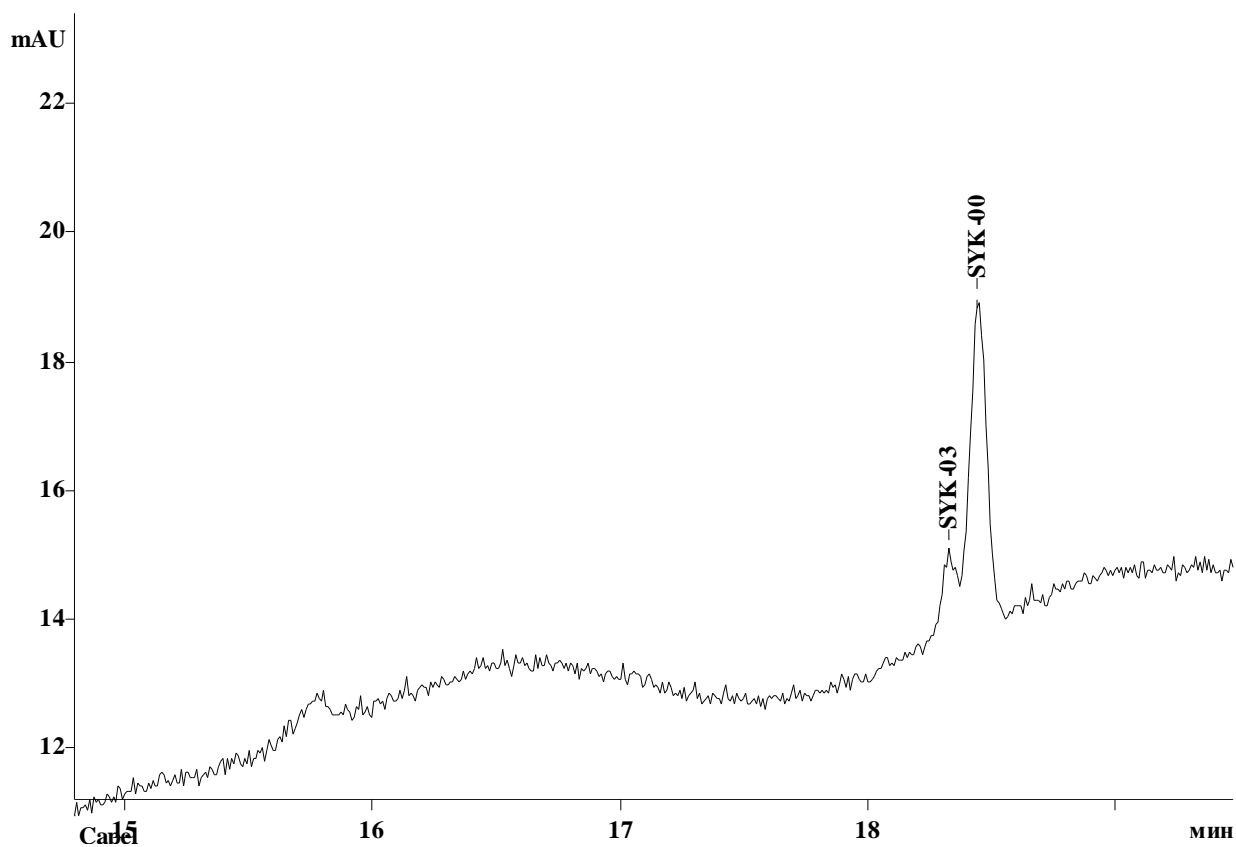
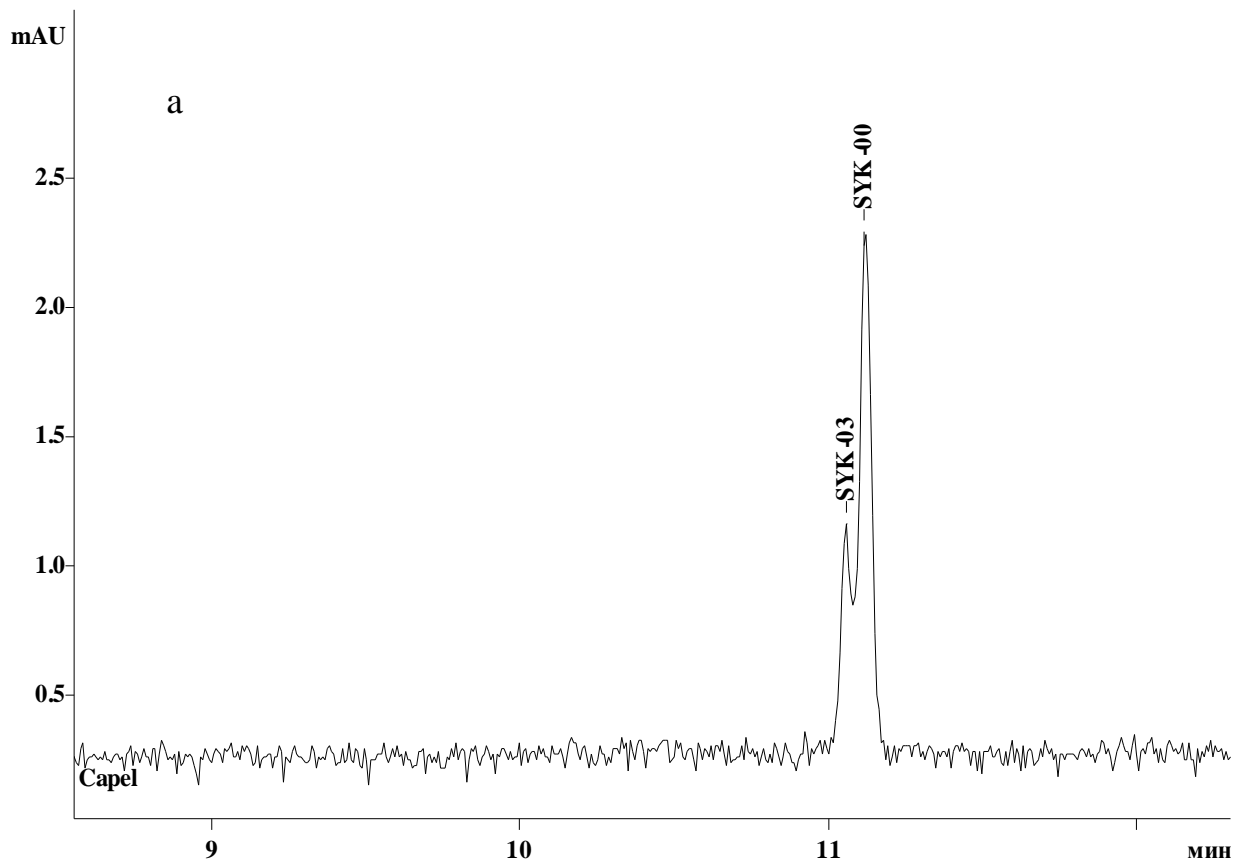


Рис. 2. Электрофореграмма модельной смеси МТ-SYK-00 и МТ-SYK-03 в условиях МЭКХ (концентрация додецилсульфата натрия 10 мг/мл) с добавкой метанола

Полученные данные свидетельствуют об улучшении параметров разделения изучаемых веществ, что позволяет проводить качественную их оценку. В то же время для количественного определения полученного разделения не достаточно. Также необходимо отметить, что дальнейшее повышение концентрации метанола (до 20%) в составе ведущего электролита значительно увеличивало время анализа, что также является не желательным эффектом. Кроме того, использование органического модификатора приводило к низкой

воспроизводимости времен миграции обоих веществ, что не позволяет использовать данные условия анализа для контроля их качества.

Еще одним важным модификатором в МЭХХ является мочевины [4]. Связано это с тем, что за счет образования клатратов мочевины удается повлиять на коэффициент распределения, что, в свою очередь, также может приводить к улучшению селективности анализа. В связи с этим на заключительном этапе оптимизации условий разделения новых ингибиторов SYK-киназы осуществляли добавку мочевины к ведущему электролиту. При этом ее содержание в буфере составляло от 10 до 40% (от 100 до 400 мг/мл) (рис. 3).



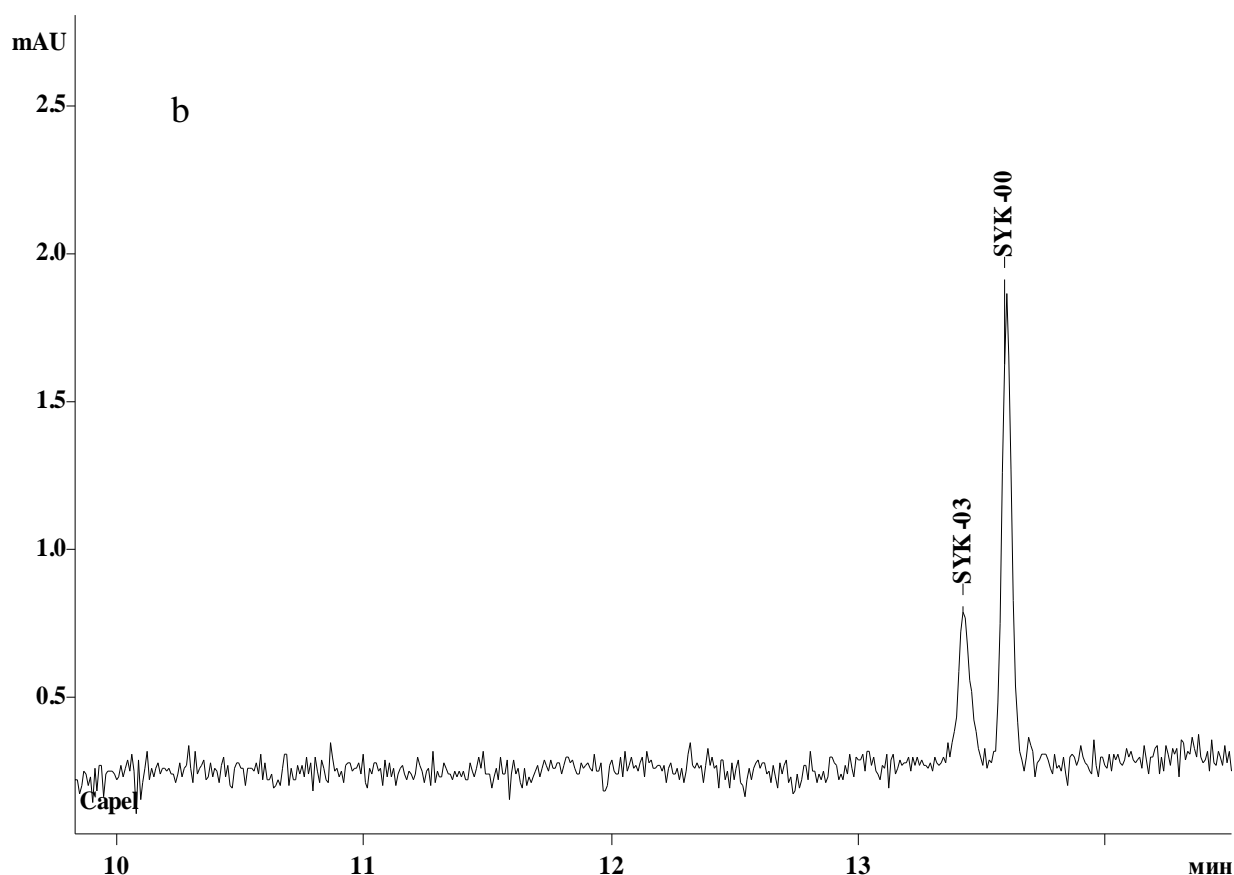


Рис.3. Электрофореграмма модельной смеси МТ-SYK-00 и МТ-SYK-03 в условиях МЭКХ (концентрация додецилсульфата натрия 10 мг/мл) с добавкой мочевины: а – 20%, б – 40%

В результате было показано, что только при концентрации мочевины в 40% в ведущем электролите удается достичь приемлемых параметров разделения анализируемых веществ. Полученные параметры пиков веществ приведены в таблице 2.

Таблица 2

Параметры пиков МТ-SYK-00 и МТ-SYK-03, полученные в условиях МЭКХ с добавкой мочевины

Шифр соединения	Эффективность, ТТ	Асимметрия	Разрешение между пиками
МТ-SYK-03	400 000	1,2	2,38
МТ-SYK-00	580 000	1,2	

Параметры разделения, а также характеристики обоих пиков свидетельствуют о приемлемости выбранных условий анализа, что позволяет использовать их для дальнейшей разработки методик количественного определения новых ингибиторов SYK-киназы в лекарственных препаратах.

Выводы

В результате изучения электрофоретического поведения новых ингибиторов SYK-киназы (шифр МТ-SYK-00 и МТ-SYK-03) в условиях МЭКХ выбраны оптимальные условия их анализа. При этом разделения веществ удалось достичь при использовании в качестве ведущего электролита раствора натрия тетрабората декагидрата с концентрацией 2 мг/мл и добавками додецилсульфата натрия (10 мг/мл) и мочевины (400мг/мл).

Список литературы

1. Гаврилин М.В. Изучение стабильности мельдония в водных растворах методами мицеллярной электрокинетической хроматографии и масс-спектрометрии / М.В. Гаврилин, Ю.В. Мудрецова // Хим.-фармац. журн. – 2014. – Том 88, № 2. – С. 53-56.
2. Каратеев Д.Е. Ингибиторы киназ при ревматоидном артрите: реальность и перспективы // Медицинский совет. – 2013. - №12. – С. 90-96.
3. Bonfichi R., Dallanoce C., Lociuo S. Free-solution capillary electrophoretic resolution of chiral amino acids via derivatization with homochiral isothiocyanates. Part I // J. Chromatogr. A. 1995. V. 707. P. 355-365.
4. Geiser L., Cherkaoui S., Veuthey J.-L. Simultaneous Analysis of Some Amphetamine Derivatives in Urine by Nonaqueous Capillary Electrophoresis Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry // J.Chrom. 2000. V. 895. P. 111-121.
5. Michalska K. Determination of linezolid and its achiral impurities using sweeping preconcentration by micellar capillary electrophoresis // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2008. – Vol.48, №2. – P. 321-330.

Рецензенты:

Компанцева Е.В., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.

Оганесян Э.Т., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой органической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.