

РАЗРАБОТКА ВЭЖХ-МС/МС-МЕТОДА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ТИАДИАЗОЛА

Попов Н.С., Малыгин А.С., Демидова М.А.

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, Тверь, e-mail: education@tvngmu.ru

Для идентификации и количественного определения нового аминокислотного производного 1,3,4-тиадиазола ЛХТ₇₋₀₉ был разработан валидированный метод ВЭЖХ-МС/МС. Максимальная чувствительность масс-спектрометрического детектирования ЛХТ₇₋₀₉ была достигнута в режиме регистрации положительных ионов при напряжении электроспрея 5500 В и потенциале декластеризации 36 В. Выявленные MRM-переходы подтвердили химическую структуру нового аминокислотного производного 1,3,4-тиадиазола. Для эффективного выделения ЛХТ₇₋₀₉ из многокомпонентных смесей тиадиазоламинов разработан градиентный режим высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием в качестве элюента смеси ацетонитрила и деионизированной воды в разных соотношениях. Для данных условий хроматографии определено время удерживания соединения ЛХТ₇₋₀₉, равное 11 минутам. Для количественного определения соединения ЛХТ₇₋₀₉ разработано градуировочное решение зависимости площади хроматографического пика от концентрации раствора.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС, хроматография, масс-спектрометрия, тиадиазол.

DEVELOPMENT OF A HPLS-MS-MS METHOD FOR IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF NEW DERIVATIVE FROM THIADIAZOLE

Popov N.S., Malygin A.S., Demidova M.A.

Tver State Medical University, Tver, e-mail: education@tvngmu.ru

Validated HPLS-ms-ms method has been developed for identification and quantification of new amino acid derivative from 1,3,4 - thiadiazole LHT₇₋₀₉. Using a registration mode of the positive ions with a voltage of the electrospray equal to 5500 V and the declustering potential equal to 36 V was achieved maximal sensitivity of the massspectrometric deflection LHT₇₋₀₉. Identified MRM-transitions are confirmed the chemical structure of new amino acid derivative from 1,3,4- thiadiazole. During the experiments was developed gradient mode of the high-performance liquid chromatography using acetonitrile and deionized water in different proportions as the eluent for efficient selection of LHT₇₋₀₉ from multicomponent mixtures. For these conditions chromatography was defined retention time of composition LHT₇₋₀₉ equal 11 minutes. For the quantitative determination of composition LHT₇₋₀₉ has been developed a calibration line of the depending the area of the chromatographic peak and the concentration of the solution.

Keywords: HPLS-MS/MS, chromatography, mass-spectrometry, thiadiazole.

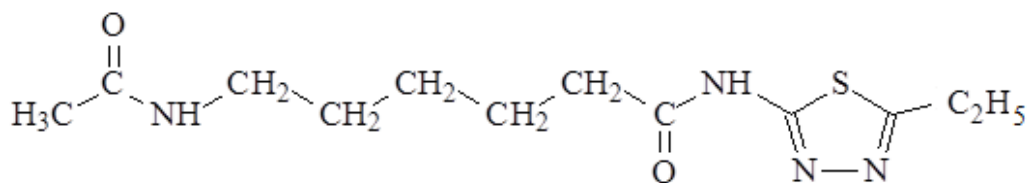
Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием является одним из наиболее перспективных методов для идентификации и количественного определения лекарственных веществ в различных биологических объектах. Метод отличается высокой специфичностью, точностью и возможностью определения веществ в минимальных концентрациях, что позволяет использовать его для количественного определения лекарственных веществ при проведении фармакокинетических исследований и лекарственного мониторинга, что является значимым для клинической лабораторной диагностики. С этой целью необходима разработка и валидация методик количественного определения различных лекарственных веществ, в том числе инновационных, на основе ВЭЖХ-МС/МС-метода.

Оригинальным лекарственным веществом из группы нестероидных противовоспалительных средств является ацексазоламид – новое производное амида 1,3,4-тиадиазола и ацексамовой кислоты. Существенным преимуществом данного соединения является невысокая токсичность и низкая ульцерогенность [5, 6]. Для проведения фармакокинетических исследований и оценки биодоступности данного лекарственного вещества при различных путях введения необходима разработка надежной методики его количественного определения в биологических жидкостях.

Целью настоящего исследования явилась разработка методики идентификации и количественного определения нового нестероидного противовоспалительного средства из группы производных тиadiaзола с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы

Объектом исследования явилось новое производное тиadiaзола с лабораторным шифром ЛХТ₇₋₀₉, синтезированное в ОАО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна) проф. С.Я. Скачиловой (рис. 1).



2-(5-этил-1,3,4-тиадиолил)амид 2-ацетиламиногексановой кислоты

Рис. 1. Химическая структура ЛХТ₇₋₀₉ (брутто формула: C₁₂H₂₀N₄O₂S; молярная масса 284,4 г/моль)

Соединение ЛХТ₇₋₀₉ по внешнему виду представляет собой порошок белого цвета, который практически не растворим в воде, растворим в спирте, легко растворим в ацетонитриле.

Для идентификации и количественного определения ЛХТ₇₋₀₉ использовали валидированный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Хроматографию осуществляли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, ФРГ). В исследовании использовали аналитическую колонку Agilent Poroshell 120 EC-C18 2,7 мкм 2,1×10 мм. Для выделения исследуемого соединения нами был разработан градиентный режим хроматографии. В

качестве элюента применяли ацетонитрил, воду деионизированную и аммония ацетат в различных соотношениях.

Для масс-спектрометрии использовали тройной квадрупольный масс-спектрометр ABSciexQTrap 3200 MD(ABSciex, Сингапур) с электрораспылительным источником ионов (TurboV с зондом TurboIonSpray). Калибровку масс-спектрометра проводили с помощью тестового раствора резерпина в концентрации $6,1 \times 10^{-2}$ мг/л.

Масс-спектрометрический анализ исследуемых образцов проводили в режиме электрораспыления при прямом вводе образца и элюата, подаваемого хроматографом. Прямой ввод исследуемых образцов в масс-хроматограф осуществляли с помощью шприцевого насоса диаметром 4,61 мм со скоростью 10 мкл/мин.

При разработке методики идентификации и количественного определения нового производного тиадиазола подбирали оптимальные условия высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-детектирования. Учитывали время выхода вещества из хроматографической колонки и MRM-переход (осуществляли регистрацию m/z иона-предшественника на первом аналитическом квадруполе Q1 и m/z ионов-продуктов на втором аналитическом квадруполе Q3). Для количественного определения ЛХТ₇₋₀₉ проводили построение калибровочного графика в диапазоне концентраций от 0,397 до 397 нг/мл.

В качестве программного обеспечения использовали AnalystMD 1.6.2.Software (ABSciex).

Результаты и обсуждение

На первом этапе экспериментального исследования осуществляли масс-детектирование исследуемого образца путем его прямого ввода в масс-детектор с помощью шприцевого насоса. На этапе пробоподготовки получали раствор ЛХТ₇₋₀₉(500 нг/мл) в смеси ацетонитрила и воды ионизированной в соотношении 2:1 с добавлением аммония ацетата (0,1%).

Предварительные эксперименты показали, что в режиме регистрации положительных ионов чувствительность определения ЛХТ₇₋₀₉ была выше, а масс-спектр интенсивнее и информативнее, чем в режиме регистрации отрицательных ионов. В связи с этим в дальнейших исследованиях использовали только режим положительной ионизации.

Для получения интенсивного пика были подобраны следующие условия масс-детектирования: положительная поляризация, напряжение электроспрея 5500,0 В, потенциал декластеризации и потенциал ввода – соответственно 36,0 и 6,5 В при давлении газа завесы 20,0 psi и газа распыления 40,0 psi, скорость 10 мкл/мин. Диапазон сканирования составлял 270–300 Да.

Анализ полученного масс-спектра на первом аналитическом квадруполе Q1 показал, что в данных условиях за счет присоединения протона водорода образуется протонированная молекула исследованного соединения $[M+H]^+$ со значением m/z 285,2 Да (рис. 2).

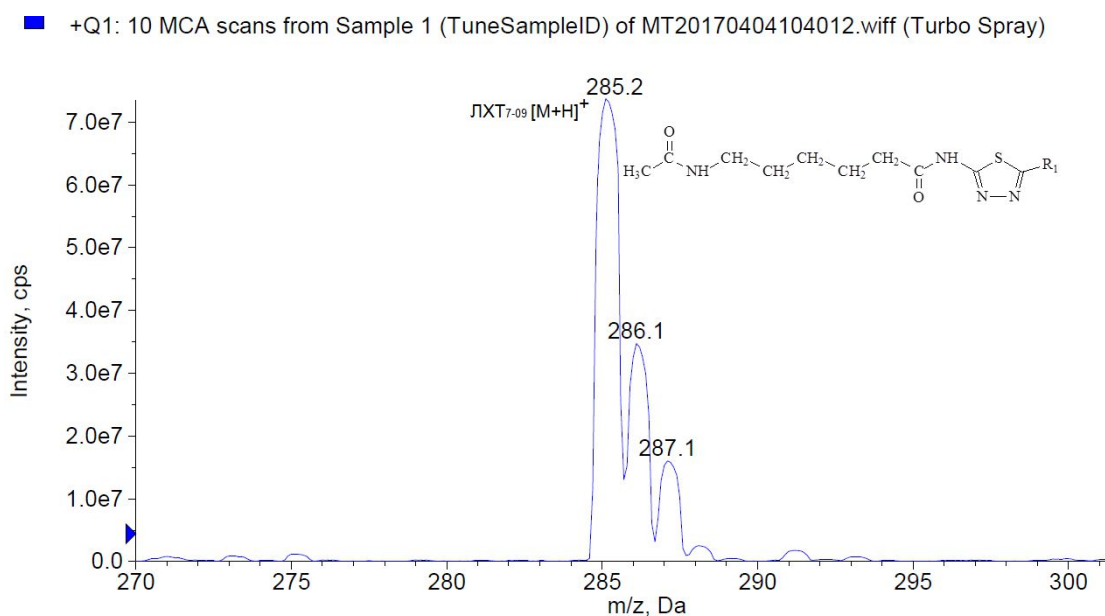
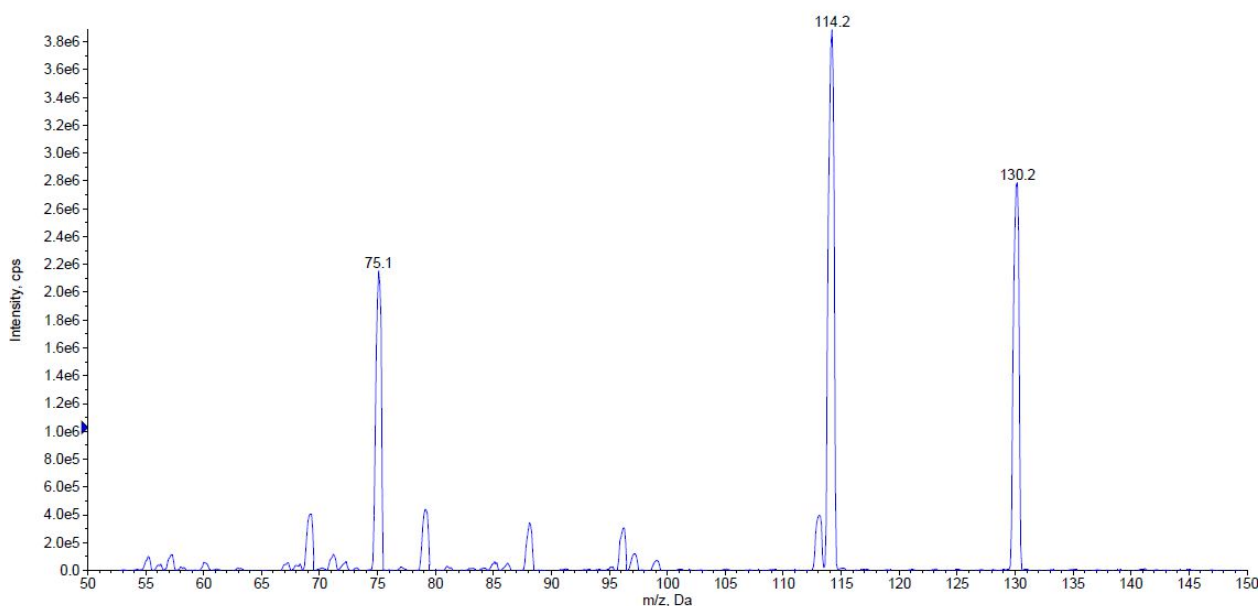


Рис. 2. Масс-спектр протонированной молекулы ЛХТ7-09 (в режиме сканирования положительных ионов $[M+H]^+$)

На втором аналитическом квадруполе Q3 осуществляли регистрацию ионов-продуктов для иона-предшественника со значением m/z 285,2 Да. Анализ масс-спектра 2 порядка показал наличие множества пиков, из которых 3 были наиболее интенсивными – m/z 114,2 Да, m/z 130,2 Да и m/z 75,1 Да (рис. 3).



Peak List for "+MS2 (285.20): 299 MCA scans from Sample 1 (TuneSampleID) of MT20170524094617.wiff (Turbo Spray)"

	m/z (Da)	Centroid mass (Da)	Resolution	Intensity (cps)	Peak area (counts)	Charges	Peak start (Da)	Peak end (Da)	Width (Da)	% Intensity
1	75.1000	75.1129	137.4186	2.1532e6	1.1544e7	Undefined	74.4000	75.5000	0.5466	55.3811
2	114.2000	114.1591	190.5049	3.8879e6	2.2197e7	Undefined	113.5000	114.6000	0.5992	100.0000
3	130.2000	130.1177	227.1122	2.7868e6	1.5555e7	Undefined	129.2000	130.5000	0.5729	71.6787

Рис. 3. Масс-спектр ионов-продуктов (в режиме сканирования положительных ионов, ион-предшественник m/z 285,2 Да)

Для получения ионного сигнала высокой интенсивности были подобраны оптимальные значения энергии в ячейке соударения Q2 (рассмотрен диапазон энергий от 0 до 400 В). Для ионов-продуктов со значениями m/z 114,2 Да, 130,2 Да и 75,1 Да оптимальная энергия в соударительной ячейке составила соответственно 27 В; 23 В и 49 В.

Предполагается, что ион-продукт со значением m/z 114,2 Да является фрагментом 5-амино-2-этил-1,3,4-тиадиазола, так как при фрагментации других производных 1,3,4-тиадиазола также выявляется ион-продукт с таким же значением m/z . Ион-продукт со значением m/z 130,2 Да, вероятно, является протонированным фрагментом ацесамовой кислоты. Таким образом, результаты проведенного масс-детектирования исследуемого образца подтвердили химическую структуру нового производного 1,3,4-тиадиазола.

На следующем этапе экспериментального исследования осуществляли анализ исследуемого соединения методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии.

В режиме ВЭЖХ-МС/МС использовали следующие условия ионизации: напряжение электроспрея 5500,0 В, скорость потока подвижной фазы 400 мкл/мин, температура азота 400 °С, давление газа завесы и распыляющего потока 20,0 и 50,0 psi соответственно. Скорость регистрации единичных масс-спектров составила 100 спектров в секунду. Для получения суммированного масс-спектра на хроматограмме выделяли временной промежуток 10,5–11,5 мин; по интенсивности сигнала ионов-продуктов строили кривые временной зависимости

ионного тока и площади пиков отдельных сигналов, соответствующих исследуемому соединению. Объем вводимой пробы в аналитическую колонку составил 10 мкл.

Для выделения исследуемого соединения был использован градиентный режим высокоэффективной жидкостной хроматографии, который обеспечивался изменением состава элюента на входе в аналитическую колонку. В качестве элюента применяли ацетонитрил, воду деионизированную и аммония ацетат в различных соотношениях. Выбор градиентного режима хроматографии был связан с тем, что в условиях изократического режима элюирования (в том числе при использовании разных концентраций ацетонитрила) не удавалось получить пик исследуемого вещества симметричной формы с пригодным для анализа временем удерживания. По данным проведенного исследования оптимальным был следующий режим подачи элюента: с 0 до 4 мин концентрация ацетонитрила 1%; с 4 по 8 мин линейное увеличение концентрации ацетонитрила до 99 %; с 8 по 12 минуту – изократический участок (1% ацетонитрила). По завершении исследования осуществляли промывку хроматографической колонки 30 % раствором ацетонитрила в течение 5 минут.

При использовании описанного режима хроматографии для исследованного соединения был получен симметричный пик достаточной интенсивности (рис. 4).

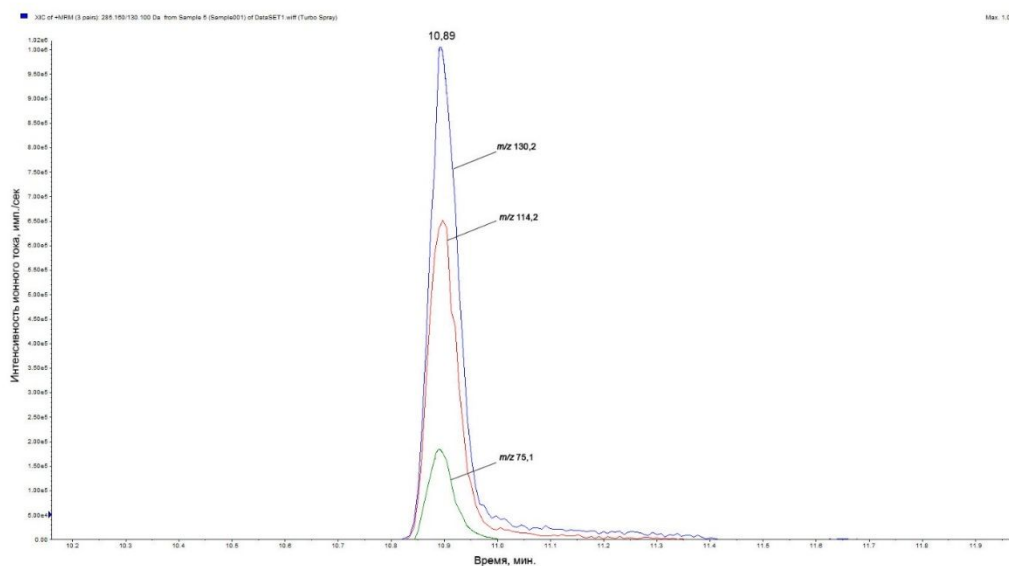


Рис. 4. Хроматограмма ЛХТ 7-09 (аналитическая колонка Agilent Poroshell 120 EC-C18 2,7 мкм 2,1×10 мм; градиентный режим хроматографии)

Анализ полученных хроматограмм для растворов ЛХТ 7-09 разной концентрации показал, что время удерживания (tR) при данных условиях элюирования составило 11 минут и не зависело от концентрации исследуемого вещества. В связи с этим значение времени удерживания можно использовать в качестве дополнительного критерия подтверждения подлинности ЛХТ 7-09 в составе многокомпонентных смесей. Обращает на себя внимание тот

факт, что данные параметры хроматографии можно использовать для идентификации ЛХТ 7-09 не только с помощью масс-детектора, но и других детекторов, в том числе фотометрического.

Для количественного определения нового производного тиадиазола осуществляли построение калибровочного графика в диапазоне концентраций от 0,397 нг/мл до 397 нг/мл (рис. 5).

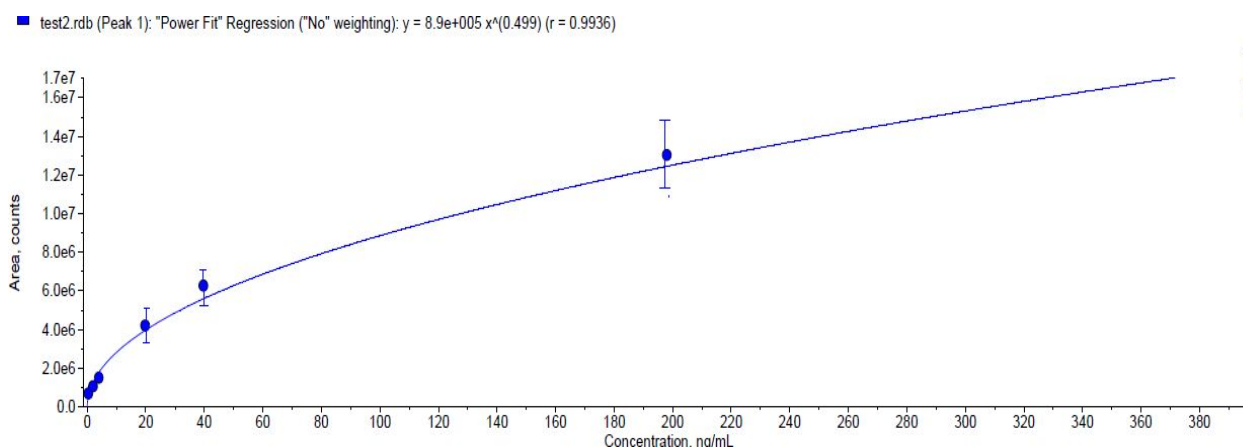


Рис. 5. Калибровочный график для определения концентрации ЛХТ7-09 (по оси абсцисс – концентрация ЛХТ7-09 в нг/мл, по оси ординат – площадь пика в импульсах)

Для разработки градуировочного решения использовали растворы ЛХТ7-09 в концентрациях 0,397; 1,980; 3,970; 19,8; 39,7; 198,0; 397,0 нг/мл. Зависимость площади пика от концентрации исследованного соединения описывалось следующим уравнением регрессии:

$$y = 8,9e^5 \cdot x^{0,499}, \text{ значение коэффициента регрессии составило } r=0,9936.$$

Следует отметить, что разработанное градуировочное решение позволяет с высокой точностью осуществлять количественное определение исследованного соединения в широком диапазоне концентраций, что позволяет использовать данный метод для оценки качества лекарственного вещества и для проведения фармакокинетических исследований.

Таким образом, результатом проведенного исследования явилась разработка метода идентификации и количественного определения нового аминокислотного производного тиадиазола с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Выводы

1. ВЭЖХ-МС/МС позволяет с высокой точностью осуществлять идентификацию и количественное определение нового аминокислотного производного тиадиазола.

2. Масс-детектирование нового производного тиадиазола ЛХТ 7-09 целесообразно проводить в режиме сканирования положительных ионов (MRM-переход – ион-предшественник Q1 m/z 285,2 Да; ионы-продукты Q3 m/z 114,2 Да, m/z 130,2 Да и m/z 75,1 Да).

3. Для выделения ЛХТ 7-09 из многокомпонентных смесей разработана методика высокоэффективной жидкостной хроматографии (аналитическая колонка Agilent Poroshell 120 EC-C18 2,7 мкм 2,1×10 мм; элюент ацетонитрил: вода деионизированная: аммония ацетат; градиентный режим).

Список литературы

1. Казаишвили Ю.Г., Попов Н.С. Исследование противовоспалительной активности новых производных тиadiaзола при формалиновом отеке лапы у крыс / Ю.Г. Казаишвили, Н.С. Попов // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 3. www.science-education.ru/109-9598.
2. Новые производные тиadiaзола, обладающие противогрибковой активностью / А.С. Кошевенко [и др.] // Успехи медицинской микологии. – 2015. – Т. 14. – С. 348-351.
3. Синтез и противоопухолевая активность новых фурил-2-замещенных 1,3,4-тиadiaзолов, 1,2,4-триазолов / Т.Р. Овсепян [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45. – № 12. – С. 3-7.
4. Попов Н.С., Демидова М.А. Оценка острой токсичности нового аминокислотного производного тиadiaзола при внутрибрюшинном введении мышам / Н.С. Попов, М.А. Демидова // Верхневолжский медицинский журнал. – 2016. – Т. 15, вып. 1. – С. 9-12.
5. Попов Н.С., Демидова М.А. Оценка ulcerогенности нового аминокислотного производного тиadiaзола при внутрижелудочном введении крысам / Н.С. Попов, М.А. Демидова // Врач-аспирант. – 2017. – № 1(80). – С. 71-78.
6. Синтез и противомикробная активность амидов фенилтио- и бензилсульфонилуксусных кислот на основе 2-амино-5-алкил(арилалкил)-1,3,4-тиadiaзолов / С.А. Серков [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т. 48, № 1. – С. 24-25.
7. 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. Vol. 73. No. 4. P. 937-947.
8. Eman M. Flefel, Wael A. El-Sayed, Ashraf M. Mohamed Synthesis and Anticancer Activity of New 1-Thia-4-azaspiro[4.5]decane, Their Derived Thiazolopyrimidine and 1,3,4-Thiadiazole Thioglycosides // Molecules. 2017. No. 22 (1). P. 170.
9. Jorge R.A. Diaz, Gerardo Enrique Cami. Salts of 5-amino-2-sulfonamide-1,3,4-thiadiazole, a structural and analog of acetazolamide, show interesting carbonic anhydrase inhibitory properties, diuretic, and anticonvulsant action // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2016. Vol. 12. No. 6. P. 1102-1110.

10. Naiyuan Chen, Wengui D., Guishan L., Luzhi L. Synthesis and antifungal activity of dehydroabiatic acid-based 1,3,4-thiadiazole-thiazolidinone compounds // *Molecular Diversity*. 2016. Vol. 20. No. 4. P. 897-905.
11. Yomna, I. El-Gazzar, Hanan H. Georgey, Shahenda M. El-Messery. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of new (1,2,4-triazole or 1,3,4-thiadiazole)-methylthio-derivatives of quinazolin-4(3H)-one as DHFR inhibitors // *Bioorganic Chemistry*. 2017. Vol. 72. P. 282-292.