

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ДЕТЕКТУВАННЯ РЯДУ ГІДРАЗИДІВ КАРБОНОВИХ КИСЛОТ І 2-АЦИЛГІДРАЗИН-КАРБОТІОАМІДІВ МЕТОДОМ ВЕРХ-ЕСІ-МС

Ключові слова: високоефективна рідинна хроматографія, мас-спектрометрична детекція, іонізація в електроспреї, гідразиди, 2-ацилгідразин-карботіоаміди, оптимізація

Похідні 1,2,4-триазолу є потенційними лікарськими речовинами з різноманітною біологічною активністю. Контроль стадій отримання таких сполук на дослідницькому і виробничому етапі є важливим завданням сучасної фармацевтичної науки. Велике значення має дослідження здатності цих речовин до адсорбції, а також процесів їх розподілу, метаболізму та екскреції. Найбільш універсальним і селективним методом, що дає змогу підтверджувати структуру, визначати кількість аналітів в таких дослідженнях є високоефективна рідинна хроматографія з мас-спектрометричним детектуванням (ВЕРХ-МС), зокрема з іонізацією в електроспреї (ВЕРХ-ЕСІ-МС).

Необхідною вимогою розроблення ВЕРХ-ЕСІ-МС методик є оптимізація хроматографічного розділення та мас-спектрометричного детектування, для цього необхідно вивчити вплив концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі на час утримання, встановити параметри градієнтного елюювання, визначити характеристичні іони, тиск газу небулайзера, швидкість газу осушувача, його температуру, напругу на фрагментаторі (напругу в ділянці розпаду, ініційованого зіткненнями).

Метою дослідження було визначення оптимальних умов мас-спектрометричного детектування для ВЕРХ-ЕСІ-МС ряду гідразидів і карботіоамідів, речовин-попередників у синтезі солей 1,2,4-триазол-3-іл-тіоуксусних кислот, потенційних лікарських речовин, по 8 схемах синтезу за допомогою повного факторного експерименту по 3 факторам та рівнянь поліноміальної регресії.

Існує велика кількість робіт, присвячених розробленню ВЕРХ-МС-методик на одноквадрупольних приладах [1–5], вони пропонують оптимальні умови ЕСІ-МС. Так, наприклад, в роботі [1] було використано ВЕРХ-МС систему Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Germany) з одноквадрупольним мас-спектрометричним детектором (G1946D) з іонізацією в електроспреї.

L. M. Mallis зі співав. [2] під час створення системи відкритого доступу для визначення субстанцій лікарських речовин виконували дослідження за допомогою ВЕРХ-МС системи Waters (Micromass) з Z-спрей-іонізацією електророзпиленням.

Zakia Benayad зі співав. під час визначення флавоноїдних глікозидів використовували таке обладнання: ВЕРХ – Waters 717, МС – Waters 600 controllers, Hewlett-Packardseries 1100 MSD, Agilent Technologies, Aldbronn, Germany [3].

Hong-Fei Duanata ін. під час визначення цефкапенової кислоти в плазмі крові у разі фармакокінетичних досліджень застосували Agilentseries 1100 LC/MSD VL с одноквадрупольним мас-спектрометричним детектором з іонізацією в електроспреї (Agilent Technologies, PaloAlto, CA, USA) [4].

Робота Lingjun Li та ін. присвячена визначенню дексаметазона ацетата в шкірі мишей, при цьому автори застосували Shimadzu ВЕРХ-МС-систему з Shimadzu 2010EV одноквадрупольним мас-спектрометром з інтерфейсом електророзпилення [5].

Матеріали та методи дослідження

Використовували субстанції сполук, які було синтезовано на кафедрах фізичної та колоїдної хімії (зав. кафедри д-р фарм. наук, доцент Каплаушенко А. Г.), токсикологічної та неорганічної хімії (зав. кафедри д-р фарм. наук, проф. Панасенко О. І.) Запорізького державного медичного університету, склад яких було доведено за допомогою ПМР, ІЧ-, хромато-мас-спектрометричного аналізу [6–9]: фуран-2-карбогідразид (2), 2-морфоліноацетогідразид (3), 2-метоксибензогідразид (4), 2-ізонікотіноіл-N-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоамід (5), 2-(фуран-2-карбоніл)-N-фенілгідразин-1-карботіоамід (6), 2-(2-морфоліноацетіл)-N-фенілгідразин-1-карботіоамід (7), N-метил-2-(2-морфоліноацетил)гідразин-1-карботіоамід (8), 2-(2-метоксибензоіл)гідразин-1-карботіоамід (9). Субстанцію ізоніазиду (1) кваліфікації «х. ч.» було придбано в компанії «Укроргсинтез».

Наважку речовини масою 1 мг розчиняли в 1 мл 50%-го ацетонітрилу. Дослідження виконували прямим введенням зразка в камеру іонізації без хроматографічної колонки.

Прилад LC MS: Agilent 1260 Infinity HPLC System (дегазатор, бінарний насос, автосамплер; одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6120 с іонізацією в електроспрєї (ESI); OpenLAB CDS Software. Умови ВЕРХ-МС дослідження: 1) ізократичний режим, з використанням буферного розчину: А – $H_2O(HCOOH 0,1\%)$ та розчину органічного модифікатора, В – $CH_3CN(HCOOH 0,1\%)$; 50:50; 2) швидкість потоку елюента 0,4 мл/хв; 3) джерело іонів – API-ES; 4) SIM-режим реєстрації іонів, відповідно до молекулярної маси сполук; 5) позитивна полярність; 6) швидкість газу-осушувача (азоту) – 10 л/хв; 7) напруга на капілярі – 4 000 В. Програмний пакет для статистичного аналізу Statistica 8, надбудова «Пошук рішення» програми Excel.

Результати дослідження та обговорення

У разі мас-спектрометричних досліджень істотне значення має тиск на небулайзері, швидкість газу-осушувача (азоту), температура газу-осушувача.

Температуру газу-осушувача, швидкість елюента рекомендовано програмним комплексом OpenLAB CDS – 300 °С, але вона залежить від швидкості елюента, швидкості газу-осушувача, термостабільності зразка. Тиск на небулайзері пропонувано від 20 до 60 psig, залежно від швидкості елюента – від 100 мкл/хв до 1 мл/хв. Напруга на фрагментаторі може змінюватись залежно від стійкості хімічних зв'язків.

Швидкість елюента вибрано 400 мкл/хв. Швидкість газу-осушувача вибрано згідно з рекомендаціями програми – 10 л/хв, напругу на капілярі – 4 000 В. Необхідно було оптимізувати температуру газу-осушувача, тиск на небулайзері, напругу на фрагментаторі.

Було використано схему повного факторного експерименту по 3 факторам. Фактори – напруга на фрагментаторі (U, В), тиск на небулайзері (p, psig), температура газу-осушувача (азоту) (t, °С) – варіювалися за 3 рівнями: U – 0, 150, 300 В; p – 10, 30, 60 psig; t – 100, 200, 300 °С. План повного факторного експерименту наведено в табл. 1.

План повного факторного експерименту дослідження умов детектування досліджуваних речовин за допомогою ЕСІ-МС-детектора

№ з/п	Температура газу-осушувача, Т, °С	Напруга на фрагментаторі, U, В	Тиск газу небулайзера, Р, psi
1	100	0	10
2	100	0	30
3	100	0	60
4	100	150	10
5	100	150	30
6	100	150	60
7	100	300	10
8	100	300	30
9	100	300	60
10	200	0	10
11	200	0	30
12	200	0	60
13	200	150	10
14	200	150	30
15	200	150	60
16	200	300	10
17	200	300	30
18	200	300	60
19	300	0	10
20	300	0	30
21	300	0	60
22	300	150	10
23	300	150	30
24	300	150	60
25	300	300	10
26	300	300	30
27	300	300	60

Параметром, що оптимізували, є площа піків на хроматограмі. Максимальне значення площі піка відповідало оптимальним умовам детектування.

За допомогою програмного пакета для статистичного аналізу «Statistica 8» отримано рівняння поліноміальної регресії, коефіцієнти регресії та квадрати коефіцієнтів регресії (табл. 2). За розрахованими рівняннями з використанням надбудови «Пошук рішення» програми Excel знайдено оптимальні значення факторів. Пошук зійшовся по ймовірності до глобального рішення.

Рівняння регресії й оптимальні умови мас-спектрометричного визначення досліджуваних речовин

Речовини	SIM, m/z	Рівняння регресії	R, R ²	Оптимальні умови		
				T	U	P
1	138	$S=4606693,73-1615,2706*T-18,285083*T^2+251916,993*U-950,35852*U^2+311965,327*P-2204,1330*P^2$	0,861290 0,741820	100	133	60
2	127	$S=-783703,30+99362,6897*T-252,25474*T^2-82862,642*U+153,530175*U^2+83134,1035*P+624,395005*P^2$	0,719183 0,517224	197	0	60
3	160	$S=37164659,8-38963,568*T+3,03529556*T^2-32335,124*U-342,80577*U^2+374593,341*P-706,54903*P^2$	0,885691 0,784448	100	0	60
4	167	$S=7855002,47-45237,401*T+108,970634*T^2-36146,831*U+52,0642311*U^2+121544,525*P-1153,7580*P^2$	0,899302 0,808744	100	0	53
5	303	$S=4348929,64+24715,8935*T-89,870435*T^2+129496,561*U-482,43898*U^2+137671,919*P-1254,2047*P^2$	0,834374 0,696180	138	134	55
6	262	$S=1034860,84-5037,4617*T+9,03074657*T^2+4262,78982*U-20,146115*U^2+20112,7906*P-189,76630*P^2$	0,559011 0,312493	100	106	53
7	295	$S=4395899,70+3130,45444*T-22,692719*T^2+142201,890*U-550,58065*U^2+213114,967*P-2160,5353*P^2$	0,947276 0,897332	100	129	49
8	233	$S=4032066,38-8240,8806*T+15,1648602*T^2+26762,5377*U-132,85517*U^2+74566,0325*P-754,55410*P^2$	0,823518 0,678182	100	101	49
9	226	$S=991916,101+7553,13891*T-35,978985*T^2-693,81018*U-2,0207152*U^2+87695,6160*P-1133,6997*P^2$	0,429386 0,184373	105	0	39

Як випливає з табл. 2, спостерігається деяка залежність умов від структури речовин. Так, для більшості гідразидів найкращим є нульове значення напруги на фрагментаторі, що пов'язано з лабільністю зв'язків. Досліджувані сполуки, що є гідразидами та карботіоамідами, мають деяку термолабільність, тому для більшості речовин рекомендуємо температуру газу-осушувача близько 100 °С.

Висновки

1. На підставі знаходження максимумів розрахованих функцій поліноміальної регресії отримано оптимальні умови мас-спектрометричного детектування для ВЕРХ-ЕСІ-МС ряду гідразидів і карботіоамідів, речовин-попередників у синтезі солей 1,2,4-триазол-3-іл-тіоуксусних кислот, потенційних лікарських речовин, по 8 схемах синтезу за допомогою повного факторного експерименту по 3 факторам.

2. Запропоновано рівняння поліноміальної регресії для відповідних гідразидів та карботіоамідів, які показують залежність інтенсивності сигналу мас-детектора від трьох важливих факторів: температури газу-осушувача, напруги на фрагментаторі, тиску на небулайзері.

3. Вибір оптимальних умов мас-спектрометричного детектування дає змогу максимально збільшити сигнал на детекторі й, таким чином, збільшити чутливість та вибірковість визначень. Тому що такі умови мають деяку специфічність, це дасть можливість частково відділити сигнал досліджуваних речовин від сигналу домішок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Jovic Z., Zivanovic L., Radisic M. et al. Chemometrically Assisted Development and Validation of LC–UV and LC–MS Methods for Simultaneous Determination of Torasemide and its Impurities // J. Chromatogr. Sci. – 2012. – V.50. – P. 324–334.
2. Mallis L. M., Sarkahian A. B., Kulishoff J. M. et al. Open-access liquid chromatography-mass spectrometry in a drug discovery environment // J. Mass Spectrom. – 2002. – V. 37. – P. 889–896.
3. Benayad Z., Gómez-Cordovés C., Es-Safi N. E. Characterization of Flavonoid Glycosides from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Crude Seeds by HPLC–DAD–ESI/MS Analysis // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – V. 15. – P. 20668–20685.
4. Duan H.-F., Ding L., Li X.-B. et al. Determination of cefcapene acid by LC–MS and their application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers // J. Pharm. Sci. – 2013. – V. 3, N 2. – P. 84–92.
5. Li L., Ma P., Wei J. et al. LC-ESI-MS method for the determination of dexamethasone acetate in skin of nude mouse // J. Chromatogr. B. – 2013. – V. 933. – P. 44–49.
6. Каплаушенко А. Г., Панасенко О. І., Книш Є. Г. та ін. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості 2-(5-R₁-4-R₂-1,2,4-триазол-3-тіо)-ацетатних кислот // Фармац. журн. – 2008. – № 2. – С. 67–72.
7. Каплаушенко А. Г. Синтез, будова і біологічна активність похідних 4-моно- та 4,5-дизаміщених 1,2,4-триазол-3-тіону: Автореф. дис. ... д-ра фарм. наук.: 15.00.02. / Запорізький держ. мед. ун-тет, 2012. – 43 с.
8. Шербіна Р. О., Панасенко О. І., Книш Є. Г. та ін. Синтез і фізико-хімічні властивості 2-((4-R-3-(морфолінометилен)-4Н-1,2,4-триазол-5-іл)тіо)-ацетатних кислот // Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики. – 2014. – № 3. – С. 18–21.
9. Самелюк Ю. Г., Каплаушенко А. Г. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості 2-(5-(метоксифеніл)-1,2,4-триазол-3-тіо)ацетатних кислот та їх естерів // Там само. – 2013. – № 2. – С. 125–128.

Надійшла до редакції 20. 04. 2015.

Б. О. Варинский

Запорожский государственный медицинский университет

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ РЯДА ГИДРАЗИДОВ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И 2-АЦИЛГИДРАЗИН-КАРБОТИОАМИДОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ-ЭСИ-МС

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрическая детекция, ионизация в электроспрее, гидразиды, 2-ацилгидразин-карботиоамиды, оптимизация

АННОТАЦИЯ

Контроль стадий получения гидразидов и карботиоамидов, исходных при синтезе солей 1,2,4-триазол-3-ил-тиоацетатных кислот, на исследовательском и производственном этапе является важной задачей. Большое значение имеет исследование адсорбции, распределения, метаболизма и экскреции данных веществ. Наиболее универсальным и селективным методом, применяемым в этих случаях, является ВЭЖХ-МС.

Целью нашего исследования являлось определение оптимальных условий масс-спектрометрического детектирования с ионизацией в электроспрее (ВЭЖХ-МС) изоникотиногидразида, фуран-2-карбогидразида, 2-морфолиноацетогидразида, 2-метоксibenзогидразида, 2-изоникотиноил-N-(2-метоксифенил)гидразин-1-карботиоамида, 2-(фуран-2-карбонил)-N-фенилгидразин-1-карботиоамида, 2-(2-морфолиноацетил)-N-фенилгидразин-1-карботиоамида, N-метил-2-(2-морфолиноацетил)гидразин-1-карботиоамида, 2-(2-метоксibenзоил)гидразин-1-карботиоамида, веществ-предшественников в синтезе солей 1,2,4-триазолуксусных кислот, потенциальных лекарственных веществ, по 8 схемам синтеза с помощью полного факторного эксперимента по 3 факторам и уравнений полиномиальной регрессии.

Работа была выполнена с использованием техники прямого ввода образца в источник ионов на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity HPLC Systemс одноквадропольным мас-спектрометром Agilent 6120.

На основании нахождения максимумов рассчитанных функций полиномиальной регрессии получены оптимальные условия масс-спектрометрического детектирования для ВЭЖХ-ЭСИ-МС ряда гидразидов и карботиоамидов. Предложены уравнения полиномиальной регрессии для соответствующих гидразида и карботиоамидов. Уравнения показывают зависимость интенсивности сигнала масс-детектора от трех важных факторов: температуры газа-осушителя, напряжения на фрагментаторе, давления на небулайзере. Выбор оптимальных условий масс-спектрометрического детектирования позволяет максимально увеличить сигнал на детекторе и, таким образом, увеличить чувствительность и избирательность определений. Это дает возможность частично отделить сигнал исследуемых веществ от сигнала примесей, потому что такие условия являются специфичными.

Key words: high performance liquid chromatography, mass spectrometric detection, electrospray ionization, hydrazides, carbothioamids, optimization

ABSTRACT

Elaboration of control steps of hydrazids and carbothioamids, raw materials in the synthesis of 1,2,4-triazol-3-yl-thioacetate acids, potential drug substances on research and production stage is an important task. The study of adsorption, distribution, metabolism and excretion of these substances has great importance. The HPLC-MS is the most universal and selective method used in these cases.

The aim of our study was to determine the optimal conditions for mass spectrometric detection of ionization in electrospray in HPLC-MS izonicotinohydrazide, furan-2-carbohydrazide, 2-morpholinoacetohydrazide, 2-methoxybenzohydrazide, 2-isonicotinoyl-N-(2-methoxyphenyl)hydrazine-1-carbothioamide, 2-(furan-2-carbonyl)-N-phenylhydrazine-1-carbothioamide, 2-(2-morpholinoacetyl)-N-phenylhydrazine-1-carbothioamide, N-methyl-2-(2-morpholinoacetyl)hydrazine-1-carbothioamide, 2-(2-methoxybenzoyl)hydrazine-1-carbothioamide, precursor substances in the synthesis of salts of 1,2,4-triazol-3-yl-thioacetate acids for 8 synthetic schemes using full factorial design on 3 factors and polynomial regression equations.

Work was carried out using flow injection analysis (the technique of direct sample introduction into the ion source) on a liquid chromatograph Agilent 1260 Infinity HPLC System with a single quadrupole mass spectrometer Agilent 6120.

The optimal conditions of mass spectrometric detection series hydrazides and carbothioamides for HPLC-ESI-MS on the basis of the calculated maxima polynomial regression functions were obtained. The equation of polynomial regression for the corresponding hydrazides and carbatioamides were suggested. The equations show the dependence of the mass detector signal intensity on three important factors: dryng gas temperature, the fragmentor voltage, the nebulizer pressure. The optimal conditions of mass spectrometric detection choice to maximize the signal detector and thus increase the sensitivity and selectivity of the determinations. It may allow partially separate the signal of these substances from the impurities signal because these conditions have specificity.

Електронна адреса для листування з авторами: varinskyi@zsmu.zp.ua