

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИТОМИЦИНА-С И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ С АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТОРОМ

Р.В. Шафигулин

к.х.н., Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева
E-mail: shafiro@mail.ru

А.В. Буланова

д.х.н., Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева

А.В. Золотарев

д.м.н., Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского

К.Н. Руссков

аспирант, Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского

Рассмотрена возможность использования амперометрического детектора для качественного и количественного определения митомицина-С и некоторых других азотсодержащих гетероциклических соединений методом ВЭЖХ.

Ключевые слова: жидкостная хроматография, амперометрическое детектирование, азотсодержащие гетероциклические соединения.

Для анализа биологически активных соединений, а также ряда лекарственных препаратов в настоящее время используют высокоэффективную жидкостную хроматографию с амперометрическим детектором (ВЭЖХ-АД). Амперометрический детектор является специфическим селективным для некоторых классов соединений, характеризуется низким пределом обнаружения и используется для количественного определения суммы антиоксидантов в пробах анализируемых продуктов и напитков [1].

Антибиотик митомицин-С, используемый, в частности, в офтальмологической практике для послеоперационного лечения, в основном определяется методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим или масс-спектрометрическим детекторами [2–4], а также некоторыми электрохимическими методами [5]. Селективное определение митомицина-С в тканях человека является актуальной задачей, решение которой важно при лечении некоторых заболеваний [6]. Азотсодержащие гетероциклические соединения, в частности, производные бензимидазола, являются потенциальными лекарственными препаратами [7], в том числе и противоопухолевыми, поэтому разработка методики их селективного определения также является актуальной задачей.

Цель исследования – изучение возможности применения амперометрического

детектора для качественного и количественного определения митомицина-С и некоторых производных бензимидазола в различных объектах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

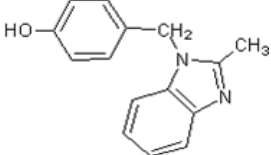
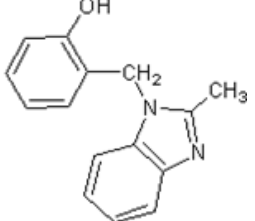
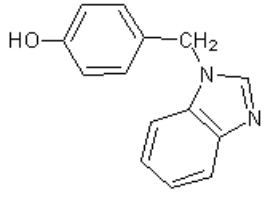
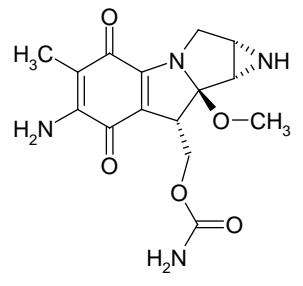
Объектом исследования являлись цитостатический противоопухолевый антибиотик митомицин-С (Киова Хакко Когио Ко. Лтд., Токио, Япония) и три производных бензимидазола, содержащие ароматическую гидроксильную группу. Бензимидазолы синтезированы на кафедре органической, биоорганической и медицинской химии Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева под руководством к.х.н. З.П. Белоусовой. Строение и чистота подтверждены методами ТСХ, ¹H ЯМР- и ИК-спектроскопии. Структурные формулы и названия исследуемых соединений представлены в табл. 1.

Хроматографическое исследование проводили в условиях обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Эксперимент выполняли на жидкостном хроматографе «Цвет-Яуза» с применением амперометрического детектора (АД). Материалом рабочего электрода детектора служил стеклоуглерод. Для обработки результатов использовали программное обеспечение «Z-Lab». Скорость подвижной фазы составляла 500 мкл/мин. Объем вводимой пробы – 10 мкл. В качестве сорбента использовали силика-

гель с привитыми октадецильными группами ZORBAX SB – C18 (4,6 ×150 мм) с размером частиц 5 мкм, в качестве элюентов – смеси ацетонитрила (MeCN) с водным раствором ацетата аммония (CH₃COONH₄) с добавлением и без добавле-

ния метанола (MeOH). Элюирование осуществляли в изократическом режиме при комнатной температуре. Бензимидазолы и митомицин-С растворяли в деионизированной воде. Концентрации бензимидазолов составляли 1–56 мг/л.

Таблица 1. Структурные формулы и названия исследуемых соединений

№	Формула	Название вещества
1		4- [(2-метил-1H-бензимидазол-1-ил) метил] фенол
2		2- [(2-метил-1H-бензимидазол-1-ил) метил] фенол
3		4- [(1H-бензимидазол-1-ил) метил] фенол
4		Митомицин -С

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ВЭЖХ-АД митомицина-С. В качестве элюента в ВЭЖХ-исследовании митомицина-С использовали смесь ацетонитрила с 0,05 М водным раствором ацетата аммония в соотношении 1:4. Для подбора оптимальных условий амперометрического детектирования в режиме прямого ввода варьировали напряжение на рабочем электроде детектора. График зависимости площади хроматографического пика митомицина-С от напряжения рабочего электрода представлен на рис. 1.

Нетрудно видеть, что интенсивность сигнала митомицина-С сильно зависит от напряжения ра-

бочего электрода. При увеличении потенциала рабочего электрода от 0,3 до 1,2 В площадь пика возрастает. Дальнейшее увеличение потенциала (до 1,3 В и выше) нецелесообразно в связи с возможностью протекания побочных электрохимических реакций (например, электролиз воды и т.д.), а также сильным дрейфом нулевой линии. Была построена градуировочная зависимость площади пика от концентрации митомицина-С. При построении градуировочной кривой использовали водные растворы митомицина-С с различными концентрациям. Градуировочный график имеет линейный диапазон от 0,08 до 8 мг/л (рис. 2). Уравнение градуировочной

кривой митомицина-С – $S = 7456 \cdot C - 169$; коэффициент детерминации – 0,999. Предел обнаружения митомицина-С составил 32 мкг/л.

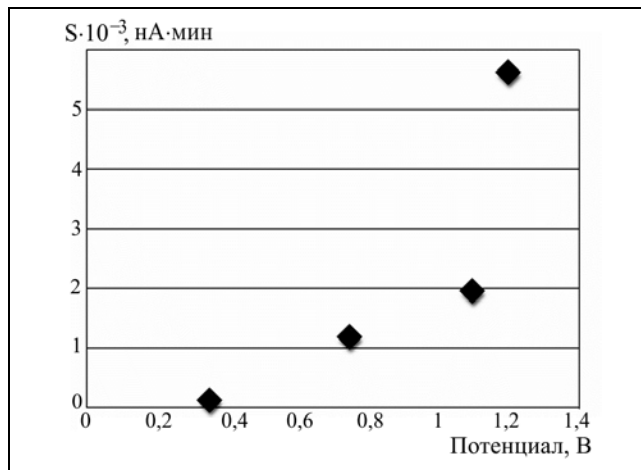


Рис. 1. График зависимости площади хроматографического пика (S) митомицина-С от напряжения рабочего электрода амперометрического детектора

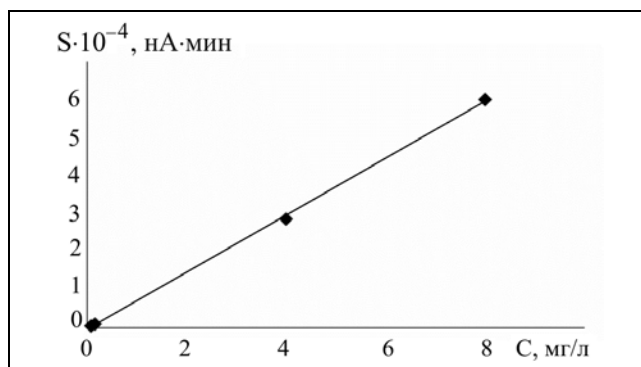


Рис. 2. Градуировочная кривая зависимости площади пика от концентрации митомицина-С

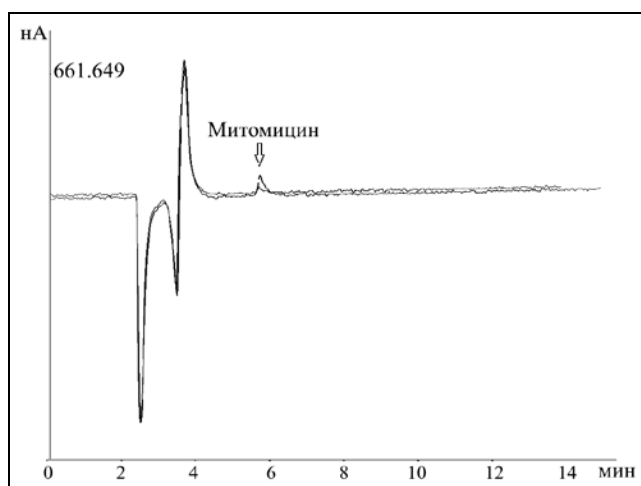


Рис. 3. Хроматограммы митомицина-С: C = 0,16 мг/л и C = 0,032 мг/л (элюент: MeCN/0,05 M водный раствор CH₃COONH₄ – 20/80 об.%)

Для оценки правильности градуировочного уравнения был проведен тест «введено-найденно» при исследовании водного стандартного раствора с известной концентрацией митомицина-С: введено – 2,00 мг/л; найдено – 2,09 мг/л; ошибка – 4,5%. Ошибка определения митомицина-С в эталонном растворе не превышает 5%, что является удовлетворительным результатом, и методика может быть использована для определения митомицина-С в реальных биологических средах.

На рис. 3 представлены хроматограммы митомицина-С с двумя предельно малыми концентрациями антибиотика в воде.

В работе показано, что применение ВЭЖХ с амперометрическим детектором позволяет определять достаточно низкие концентрации митомицина-С. Чувствительность амперометрического детектирования уступает спектрофотометрическому (1 мкг/л) и масс-спектрометрическому (15 нг/л), но является гораздо более дешевым и селективным методом при определении митомицина-С в биологических объектах.

ВЭЖХ-АД бензимидазолов. Получение сигнала амперометрического детектора для изучаемых бензимидазолов связана с наличием в их молекуле ароматической гидроксильной группы, склонной к электрохимическому окислению. Эксперименты показали, что при повышении напряжения на рабочем электроде интенсивность сигнала в разной степени усиливается для всех трех исследуемых бензимидазолов. Зависимости площадей хроматографических пиков бензимидазолов от напряжения рабочего электрода представлены на рис. 4.

Увеличение напряжения, превышающее 1,2 В, приводило к усилению шума нулевой линии и ухудшению аналитического сигнала для всех изучаемых бензимидазолов. Установлено, что наибольший сигнал амперометрического детектора достигается при определении 4-[(1H-бензимидазол-1-ил) метил]фенола. Метилпроизводные бензимидазола характеризуются более низким сигналом амперометрического детектора (рис. 5).

Очевидно, что амперометрический детектор чувствителен даже к незначительному изменению в структуре бензимидазолов.

Природа элюента также влияет на чувствительность амперометрического детектора.

При добавлении метанола в водно-ацетонитрильный раствор повышается чувствительность амперометрического детектора для всех исследуемых производных бензимидазола (рис. 6).

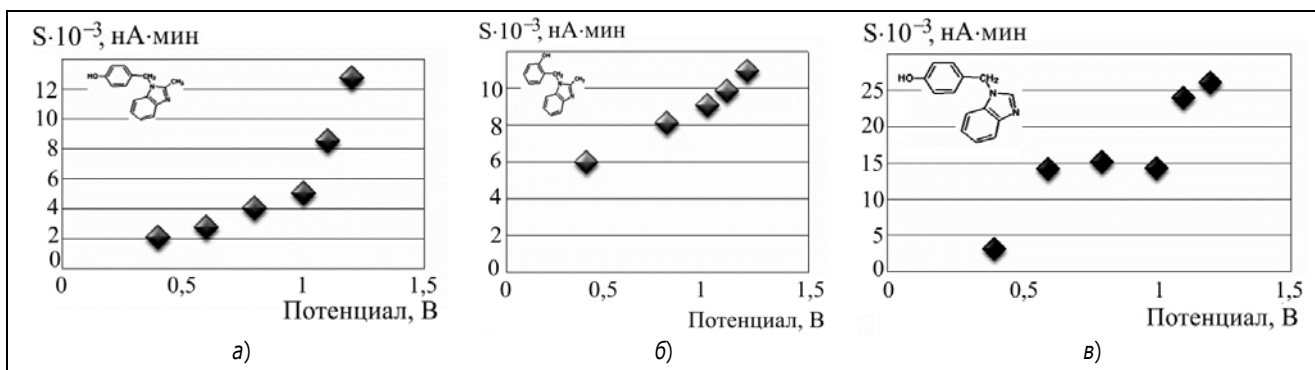


Рис. 4. Графики зависимости площади хроматографического пика от значения напряжения рабочего электрода: а - 4-[(2-метил-1Н-бензимидазол-1-ил) метил] фенол; б - 2-[(2-метил-1Н-бензимидазол-1-ил) метил] фенола; в - 4- [(1Н-бензимидазол-1-ил) метил] фенол (элюент: MeCN/0,05M водный раствор CH₃COONH₄ - 50/50 об.%)

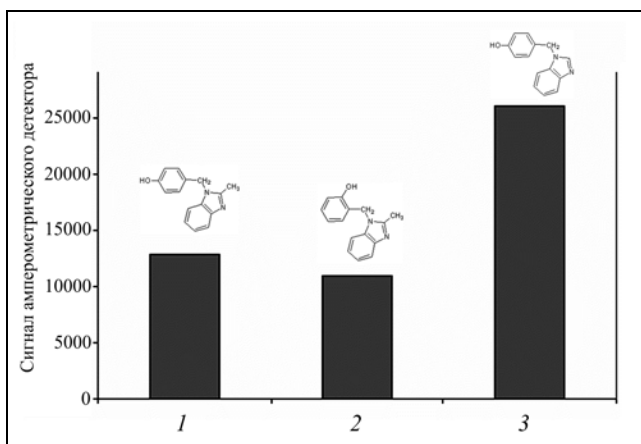


Рис. 5. Зависимость сигнала амперометрического детектора от структуры бензимидазолов: 1 - 4-[(2-метил-1Н-бензимидазол-1-ил) метил] фенол; 2 - 2-[(2-метил-1Н-бензимидазол-1-ил) метил] фенола; 3 - 4- [(1Н-бензимидазол-1-ил) метил] фенол

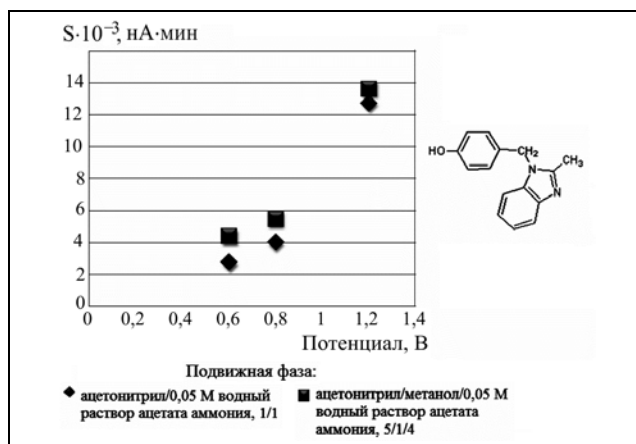


Рис. 6. Графики зависимости площади хроматографического пика для 4-[(2-метил-1Н-бензимидазол-1-ил) метил] фенола от значения рабочего электрода при использовании элюентов различной природы

Таблица 2. Уравнения градуировочных кривых исследуемых бензимидазолов

Бензимидазол	Уравнение градуировочной кривой	Коэффициент детерминации, R ²
	S = 465·C	0,999
	S = 195·C	0,999
	S = 228·C	0,999

Для производных бензимидазола были определены линейные концентрационные диапазоны амперометрического детектора (1–56 мг/л). В табл. 2 представлены линейные регрессионные уравнения.

ВЫВОДЫ

Показано, что ВЭЖХ с амперометрическим детектором позволяет анализировать митомицин-С и азотсодержащие гетероциклические соединения; на чувствительность амперометрического детектора влияют структура аналитов и природа элюента.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках государственного задания по гранту № 4.110.2014/К.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яшин А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках // Российский химический журнал об-ва им. Д.И. Менделеева. 2008. Т. LII. № 2. С. 130–135.
2. Пирогов А.В., Пащикова Е.Б., Бендрышев А.А., Ульянов Р.В., Шнигун О.А. Определение митомицина-С в тканях мочевого пузыря при лечении поверхностного рака // Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия. 2012. Т. 53. № 5. С. 320–325.
3. Сидорова А.А., Карцова Л.А., Григорьев А.В., Протоцак В.В., Мурашко Е.А. Определение митомицина С в тканях мочевого пузыря методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журнал аналитической химии. 2010. Т. 65. № 8. С. 856–860.
4. Lang W., Caldwell Gary W., Masucci J.A. Evaluation of the effect of oxygen exposure on human liver microsomal metabolism of mitomycin C in the presence of glutathione using liquid chromatography–quadrupole time of flight mass spectrometry // Analytical Biochemistry. 2005. № 343. P. 268–276.
5. Karadeniz H., Alparslan L., Erdem A., Karasulu E. Electrochemical investigation of interaction between mitomycin C and DNA in a novel drug-delivery system // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007. № 45. P. 322–326.
6. Witjes J.A., Hendricksen K. // European Urology. 2008. № 53. P. 45.
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства: пособие для врачей. М.: Новая волна. 2012. 1216 с.

Поступила после доработки 9 октября 2016 г.

DETERMINATION OF MITOMYCIN-C AND SOME OTHER NITROGEN-CONTAINING HETEROCYCLIC COMPOUNDS BY HPLC METHOD WITH AMPEROMETRIC DETECTOR

© Authors, 2017

R.V. Shafigulin

Ph.D (Chem.), Samara National Research University

E-mail: shafiro@mail.ru

A.V. Bulanova

Dr.Sc. (Chem.), Samara National Research University

A.V. Zolotarev

Dr.Sc.(Med.), Samara Clinical Ophthalmic Hospital named T.I. Eroshevsky

K.N. Russkov

Post-graduate Student, Samara Clinical Ophthalmic Hospital named T.I. Eroshevsky

High performance liquid chromatography with amperometric detector (HPLC-AD) currently used for the analysis of biologically active compounds, as well as a number of drugs. Amperometric detector is specific selective for certain classes of compounds that has a low detection limit and is used to quantify the amount of antioxidants in the analyzed samples of foods and beverages.

The aim of this study was to investigate the possibility of using amperometric detector for qualitative and quantitative determination of mitomycin-C and some benzimidazole derivatives in various objects. Chromatographic investigation was carried out by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The experiment was performed by liquid chromatograph "Cvet Yauza" using amperometric detection (AD). It is found that the minimum concentration of mitomycin-C detectable by amperometric detector is 32 µg/l.

It is shown that amperometric detector is sensitive to even minor changes in the structure of the benzimidazole. Adding methanol to the water-acetonitrile solution increases the sensitivity of amperometric detector for all investigated benzimidazole derivatives.

Key words: liquid chromatography, amperometric detection, nitrogen-containing heterocyclic compounds.

References

1. Jashin A.Ja. Inzhekcionno-protochnaja sistema s amperometricheskim detektorom dlja selektivnogo opredelenija antioksidantov v pishhevyyh produktah i napitkah // Rossijskij himicheskij zhurnal ob-va im. D.I. Mendeleeva. 2008. T. LII. № 2. S. 130–135.
2. Pirogov A.V., Pashkova E.B., Bendryshev A.A., Ul'janov R.V., Shpigun O.A. Opredelenie mitomicina-S v tkanjah mochevogo puzyrja pri lechenii poverhnostnogo raka // Vestnik Moskovskogo universiteta. Ser. 2. Himija. 2012. T. 53. № 5. S. 320–325.
3. Sidorova A.A., Karcova L.A., Grigor'ev A.V., Protoshhak V.V., Murashko E.A. Opredelenie mitomicina S v tkanjah mochevogo puzyrja metodom obrashhenno-fazovoj vysokoeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii // Zhurnal analiticheskij himii. 2010. T. 65. № 8. S. 856–860.
4. Lang W., Caldwell Gary W., Masucci J.A. Evaluation of the effect of oxygen exposure on human liver microsomal metabolism of mitomycin C in the presence of glutathione using liquid chromatography–quadrupole time of flight mass spectrometry // Analytical Biochemistry. 2005. № 343. P. 268–276.
5. Karadeniz H., Alparslan L., Erdem A., Karasulu E. Electrochemical investigation of interaction between mitomycin C and DNA in a novel drug-delivery system // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007. № 45. P. 322–326.
6. Witjes J.A., Hendricksen K. // European Urology. 2008. № 53. P. 45.
7. Mashkovskij M.D. Lekarstvennye sredstva: posobie dlja vrachej. M.: Novaja volna. 2012. 1216 s.

КОНФЕРЕНЦИЯ «МОЛОДЫЕ УЧЕНЫЕ И ФАРМАЦИЯ XXI ВЕКА»

16 декабря 2016 г. в ФГБНУ ВИЛАР состоялась IV Международная научно-практическая конференция «Молодые ученые и фармация XXI века».

С приветственным словом к участникам конференции обратились академик РАН В.А. Быков, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ ВИЛАР Н.И. Сидельников, доктор сельскохозяйственных наук А.И. Морозов, кандидат географических наук В.Ю. Масляков. В конференции приняли участие молодые ученые из разных научно-исследовательских учреждений и учебных заведений. Большой интерес вызвали доклады не только по лекарственному растениеводству, но и по современным достижениям создания новых лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья.

Итогом работы конференции стало принятие Резолюции конференции:

конференция с удовлетворением констатирует, что она выполнила поставленные задачи: тематика докладов охватила весь спектр исследований «от растения к препарату»;

материалы, представленные на конференции, являются актуальными, исследования проведены на высоком научном уровне, с использованием современных инструментальных методов и оборудования, они являются ценными для научного сообщества и имеют перспективы практического применения;

конференция считает целесообразным продолжить практику проведения конференций молодых ученых, изменив название и включив в него более широкое понятие «науки о жизни» для расширения тематики представленных докладов.

В последующих выпусках журнала «Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии» будут опубликованы лучшие работы, представленные на конференции.