

УДК 543.544.5.068.7. 543.51.
© Коллектив авторов, 2022

А.Т. Цечёев¹, Ю.Н. Карпенко^{1,2}, Е.Ю. Тумилович^{1,2}, Н.М. Игидов¹
**ВЫБОР УСЛОВИЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО 2-АМИНОПИРРОЛА
С ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

¹ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»

Минздрава России, г. Пермь

²ООО «Парма Клиникал», г. Пермь

Цель исследования. Выбор оптимальных условий tandemного масс-спектрометрического детектирования нового биологически активного соединения с цитотоксической активностью.

Материал и методы. Объектом исследования являлась субстанция 2-АБФПК (2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамида). Исследования проводили на жидкостном хромато-масс-спектрометре «LCMS-8050» (Shimadzu) с детектором типа тройной квадруполь. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке с обращенно-фазным сорбентом с использованием элюента на основе ацетонитрила и 0,1% раствора муравьиной кислоты.

Результаты и выводы. В ходе проведенных исследований было установлено, что применение электроспрейной ионизации приводит к образованию молекулярных ионов по типу протонированной, или депротонированной молекулы 2-АБФПК. Масс-спектр, полученный в режиме положительной ионизации, содержит ионы с m/z 392 и 394; при отрицательной ионизации – ионы с массами 390 и 392. Дуплет сигналов в масс-спектрах объясняется наличием в структуре соединения атома брома.

На основании изучения фрагментации молекулярных ионов в ячейке соударительной диссоциации были выбраны ионные пары для реализации режима MRM (мониторинга множественных реакций) при детектировании 2-АБФПК: 394→377; 392→375; 392→349; 390→347. Использование указанных MRM-переходов обеспечивает высокую чувствительность определения 2-АБФПК, необходимую для проведения фармакокинетических исследований. Предел обнаружения 2-АБФПК при инъекции 1 мкл пробы составил 240 фемтограмм в режиме положительной ионизации и 750 фемтограмм при отрицательной ионизации.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрическое детектирование, замещенные 2-аминопирролы.

A.T. Tsechoev, Y.N. Karpenko, E.Y. Tumilovich, N.M. Igidov
**SELECTION OF CONDITIONS FOR CHROMATO-MASS SPECTROMETRIC
DETERMINATION OF A NEW 2-AMINO PYRROLO DERIVATIVE
WITH CYTOTOXIC ACTIVITY**

The aim of study is to select optimal conditions for tandem mass-spectrometric detection of a new biologically active compound with cytotoxic activity.

Material and methods. The object of the study was the substance 2-ABPPK (2-amino-1-(4-bromophenyl)-5-(3,3-dimethyl-2-oxobutylidene)-4-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide). The studies were carried out on an LCMS-8050 liquid chromatography-mass spectrometer (Shimadzu) with a triple quadrupole type detector. Chromatographic separation was carried out on a column with a reversed-phase sorbent using an eluent based on acetonitrile and 0.1% formic acid solution.

Results and conclusions. In the course of the studies, it was found that the use of electrospray ionization leads to the formation of molecular ions similar to the protonated or deprotonated 2-ABPPK molecule. The mass spectrum obtained in the positive ionization mode contains ions with m/z 392 and 394; with negative ionization, ions with masses of 390 and 392. The doublet of signals in the mass spectra is explained by the presence of a bromine atom in the structure of the compound.

Based on the study of the fragmentation of molecular ions in the cell of collisional dissociation, ion pairs were selected for the implementation of the MRM mode (monitoring of multiple reactions) in the detection of 2-ABPPK: 394→377; 392→375; 392→349; 390→347. It was shown that the use of these MRM transitions provides a high sensitivity for the determination of 2-ABPPK, which is necessary for pharmacokinetic studies. Detection limit of 2-ABPPK upon injection of 1 µl of the sample was no more than 240 femtograms in the positive ionization mode and not more than 750 femtograms in the negative ionization mode.

Key words: high performance liquid chromatography, mass spectrometric detection, substituted 2-aminopyrroles.

Одним из важнейших направлений стратегии развития отечественной фармацевтической отрасли «Фарма-2030» является поддержка собственных разработок в области создания инновационных лекарственных средств, в том числе противоопухолевых [1].

В Пермской государственной фармацевтической академии проводятся исследования, направленные на получение и изучение свойств и биологической активности произ-

водных 2-аминопиррола, обладающих противоопухолевой активностью [2,3].

Биологически активное соединение 2-АБФПК (2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамида) продемонстрировало цитотоксический эффект в отношении широкого спектра опухолевых клеток человека, индуцируя их гибель по механизму апоптоза [4]. Структурная формула соединения 2-АБФПК представлена на рис. 1.

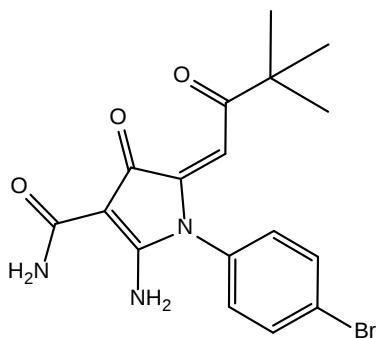


Рис. 1. Структурная формула 2-АБФПК ($C_{17}H_{18}BrN_3O_3$, М.м. 392)

Доклиническое исследование новых биологически активных соединений предусматривает изучение их фармакокинетических свойств: абсорбции, распределения, метаболизма и выведения [5]. Данные исследования требуют разработки высокочувствительных методик определения новых соединений и их возможных метаболитов в биологических объектах.

Наиболее мощным методом анализа сложных биологических образцов является метод ВЭЖХ-МС/МС, сочетающий эффективное хроматографическое разделение и высокую селективность tandemного масс-спектрометрического детектирования [6].

Проведенные ранее исследования по изучению хроматографической подвижности 2-АБФПК в условиях ВЭЖХ показали, что соединение хорошо удерживается на обращенно-фазном сорбенте (октадецилсиликагеле) при использовании водно-ацетонитрильных элюентов. Оптимальный диапазон значений коэффициента ёмкости 2-АБФПК наблюдался при содержании органического компонента в подвижной фазе от 35 до 50%. Установлено, что варьирование pH-среды элюента (от 2,0 до 8,0) практически не влияет на параметры удерживания соединения. По результатам исследований были предложены условия хроматографического определения 2-АБФПК методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием, позволяющим проводить оценку содержания родственных примесей и количественное определение в субстанции изучаемого соединения [7].

Целью настоящего исследования стал выбор оптимальных условий tandemного масс-спектрометрического детектирования биологически активного соединения 2-АБФПК с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Полученные результаты будут положены в основу разработки методики количественного определения 2-АБФПК в биологических объектах для дальнейшего изучения фармакокинетических свойств.

Материал и методы

В качестве объекта исследования была использована субстанция 2-АБФПК (серия 0122), представляющая собой светло-желтый кристаллический порошок, легко растворимый в метаноле, растворимый в диметилформамиде, уксусной кислоте, практически не растворимый в воде. В ходе эксперимента были приготовлены метанольные растворы 2-АБФПК с концентрациями 50; 1 и 0,5 нг/мл.

Исследования проводили на жидкостном хроматомасс-спектрометре «LCMS-8050» (Shimadzu) с детектором типа тройной квадруполь.

Условия хроматографического анализа: обращенно-фазная колонка: «Luna 3 мкм C18(2) 100 Å» («Phenomenex») размером 150×3,0 мм; подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1% раствор муравьиной кислоты (50:50); скорость потока элюента: 0,25 мл/мин; температура термостата колонки – 40° С.

Масс-спектрометрические условия: тип ионизации – электроспрей (+/-); напряжение на капилляре – 4000 В; температура интерфейса – 300 °С; температура нагреваемого блока – 300 °С; температура линии десольватации – 250 °С; поток газа-распылителя – 2 л/мин; поток газа-осушителя – 10 л/мин; поток нагреваемого газа – 10 л/мин.

Программное обеспечение: «Lab Solutions». В работе применяли следующие реагенты и растворители: ацетонитрил (HPLC Grade, «Fischer Chemical»), метанол («осч» для градиентной ВЭЖХ, «Химмед»), муравьиная кислота («Sigma Aldrich»).

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований были получены масс-спектры 2-АБФПК в режимах сканирования положительных и отрицательных ионов (рис. 2). Диапазон сканирования составлял 200–450 Да.

Анализ полученных масс-спектров показал наличие интенсивных ионов со значениями m/z 392 и 394 в режиме положительной ионизации, 390 и 392 – в режиме отрицательной ионизации. Данные сигналы соответствуют протонированным $[M+H]^+$ и депротонированным $[M-H]^-$ молекулам изучаемого соединения. Дуплет-сигналов в масс-спектрах объясняется присутствием в структуре изучаемого соединения атома брома, состоящего из двух стабильных изотопов массой 79 и 81.

Установлено, что интенсивность молекулярных ионов в режиме положительной ионизации примерно в 4 раза выше, чем при отрицательной ионизации (рис. 2).

Кроме того, при использовании элюента с содержанием ацетонитрила на уровне 35% в масс-спектре положительных ионов наблюдали дополнительные сигналы, соответствующие

аддуктам молекулярного иона с катионами натрия $[M+Na]^+$ (m/z 414 и 416) и калия $[M+K]^+$ (m/z 430 и 432) (рис. 3).

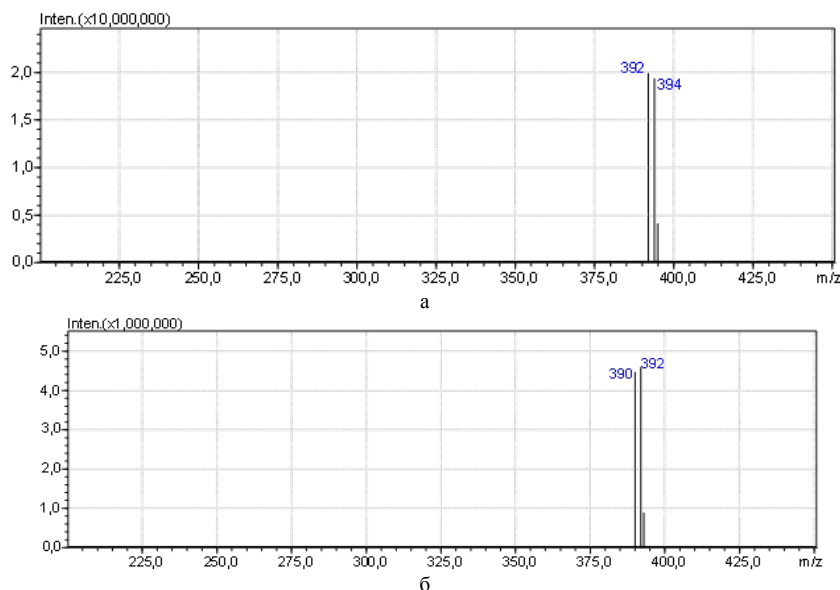


Рис. 2. Масс-спектры 2-АБФПК: а – сканирование положительных ионов; б – отрицательных ионов

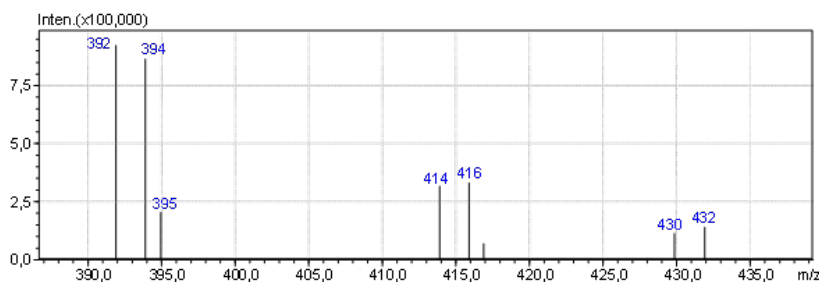


Рис. 3. Аддукты молекулярных ионов с катионами натрия (m/z 414 и 416) и калия (m/z 430 и 432)

Далее были получены масс-спектры фрагментных ионов (product ions) путем соударительной диссоциации ионов-предшественников (precursor ions) на втором квадруполе (Q3) масс-спектрометрического детектора. Ионами-предшественниками являлись молекулярные ионы с m/z 392 и 394 в режиме положительной ионизации, 390 и 392 – при отрицательной ионизации. Энергия соударительной диссоциации (СЕ) варьировала в диапазоне от 5 до 30 eV (с шагом 5 eV).

Вторичные масс-спектры 2-АБФПК, полученные с использованием энергии 25 и 30 eV, характеризовались множеством малоинтенсивных сигналов. Массы ионов 2-АБФПК, детектируемые на втором квадруполе детектора при использовании СЕ в диапазоне 5-20 eV, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Масс-спектрометрические данные 2-АБФПК		
СЕ, eV	Precursor ions (m/z)	
	392 $[M+H]^+$	394 $[M+H]^+$
	Product ions (m/z)	
– 5	392(100); 375(5,41)	394(100)
– 10	392(100); 375(16,96); 393(11,33)	394(100); 377(14,71); 395(9,16)
– 15	392(100); 375(66,62); 393(39,82)	394(100); 377(69,45); 395(40,68)
– 20	375(100); 393(84,23); 212(5,24); 251(5,14)	377(100); 395(80,54)
	Precursor ions (m/z)	
	390 $[M-H]^-$	392 $[M-H]^-$
	Product ions (m/z)	
5	390(100)	392(100)
10	390(100)	392(100)
15	390(100); 347(10,68); 219(9,09)	392(100); 349(10,49); 219(7,69)
20	390(100); 347(54,26); 219(40,58); 303(5,10); 319(5,05)	392(100); 349(50,81); 219(35,94); 321(8,61)

Анализ вторичных масс-спектров показал, что в режиме положительной ионизации наиболее интенсивными фрагментными ионами оказались ионы с m/z 375 (377), при сканировании отрицательных ионов в спектре наблюдали интенсивные сигналы от ион-продуктов с массами 219 и 347 (349).

Энергия соударительной диссоциации (CE), величиной 20 eV, обеспечила максимальное образование обозначенных осколочных фрагментов молекулярных ионов 2-АБФПК (рис. 4).

Предполагаемые схемы фрагментации молекулярных ионов 2-АБФПК представлены на рис. 5.

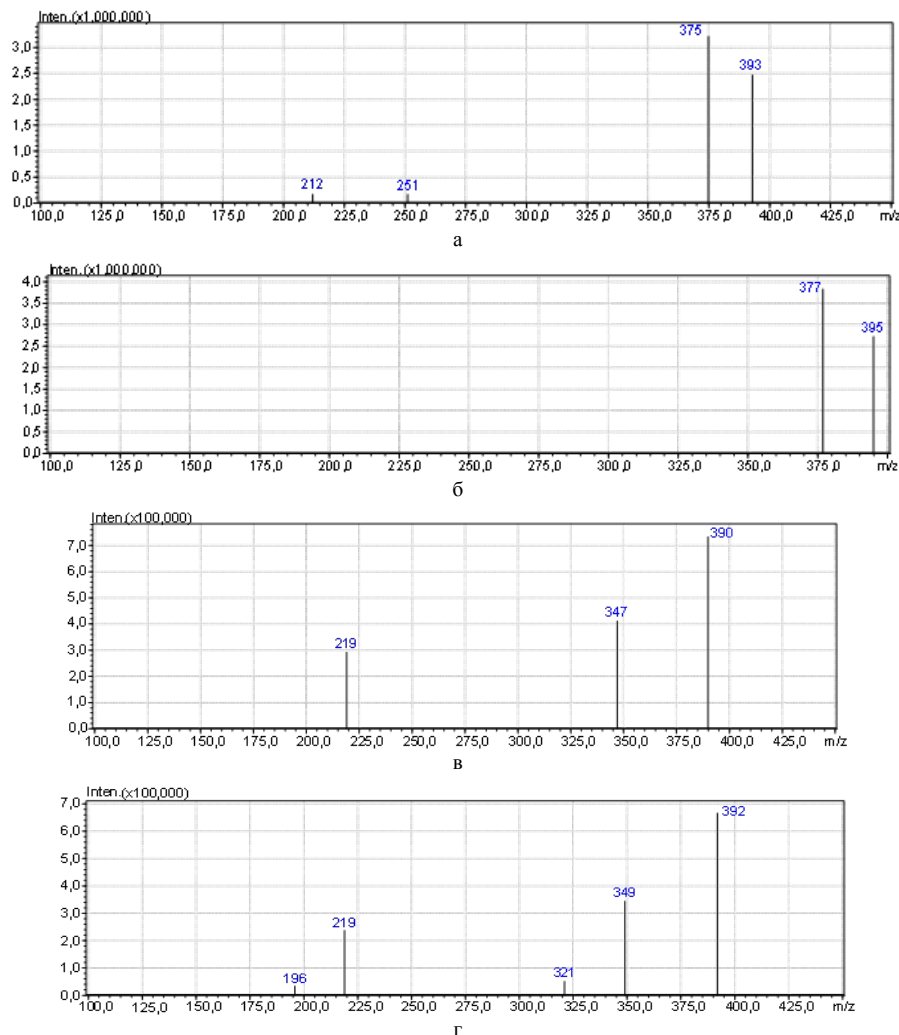


Рис. 4. Вторичные масс-спектры 2-АБФПК: (precursor ions: +392 (а); +394 (б); -390 (в); -392 (г))

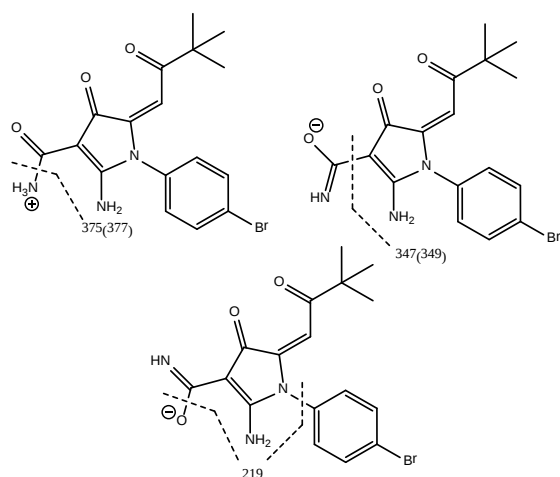


Рис. 5. Предполагаемые схемы фрагментации молекулярных ионов 2-АБФПК

Наиболее интенсивные ионы с m/z 375 (377) и 347 (349) были выбраны в качестве дочерних ионов (product ions) для реализации высокочувствительного и селективного режимов масс-спектрометрического детектирования – MRM (мониторинга множественных реакций).

Хроматограммы метанольного раствора 2-АБФПК концентрацией 50 нг/мл, полученные с использованием ионных переходов: 392→375, 394→377 (режим положительной ионизации) и 390→347, 392→349 (режим отрицательной ионизации) – представлены на рис. 6. Объем вводимой пробы составил 1 мкл.

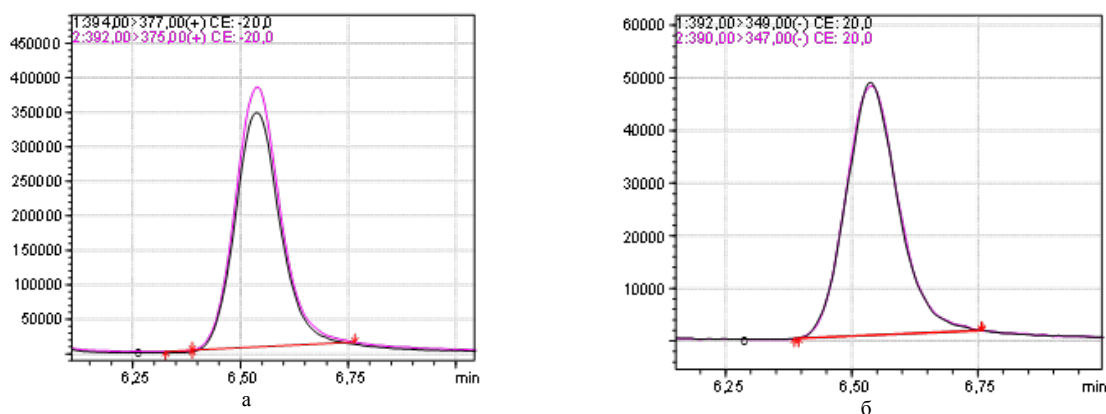


Рис. 6. Хроматограммы раствора 2-АБФПК концентрацией 50 нг/мл: а – положительная ионизация, б – отрицательная ионизация

Установлено, что отклик масс-спектрометрического детектора (площадь хроматографического пика) при использовании MRM – переходов в режиме положительной ионизации примерно в 7,5 раза выше, чем отклик при детектировании соединения на «отрицательных» переходах (табл. 2).

Дальнейшие исследования были направлены на определение предела обнаружения 2-АБФПК в условиях тандемного масс-

спектрометрического детектирования. Для этого были проанализированы растворы с низкими концентрациями соединения: 0,5 нг/мл для режима положительной ионизации и 1 нг/мл для режима отрицательной ионизации (рис. 7).

Расчет предела обнаружения 2-АБФПК осуществляли с учетом соотношения сигнал/шум. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Таблица 2

Сравнение интенсивности отклика масс-спектрометрического детектора при использовании различных ионных переходов

Режим ионизации	MRM – переход	Площадь хроматографического пика 2-АБФПК, mAU×с
Положительный	392→375	2 748 537
Положительный	394→377	2 505 446
Отрицательный	390→347	343 684
Отрицательный	392→349	349 920

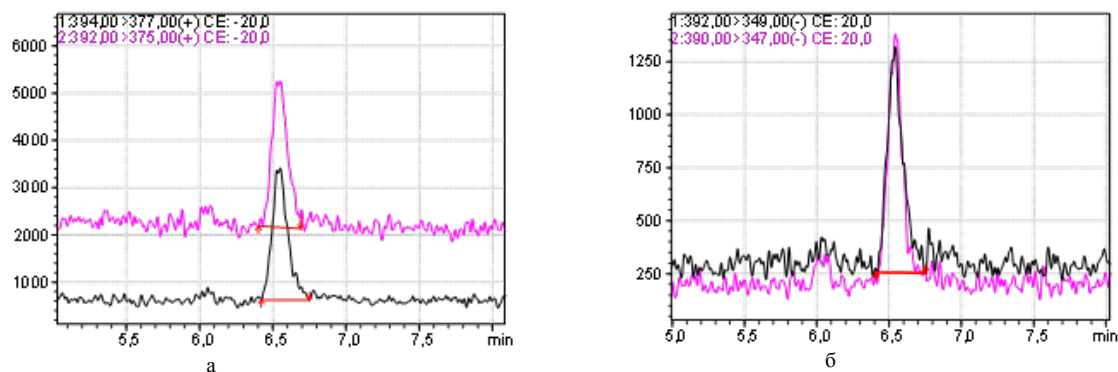


Рис. 7. Хроматограммы растворов 2-АБФПК с концентрациями: а – 0,5 нг/мл; б – 1 нг/мл (б)

Таблица 3

Пределы обнаружения субстанции для разных MRM – переходов

MRM+	394→377		392→375	
	S/N	ПО	S/N	ПО
	7,83	210 фг	6,85	240 фг
MRM-	392→349		390→347	
	S/N	ПО	S/N	ПО
	4,38	750 фг	5,54	600 фг

Установлено, что использование всех апробированных ионных переходов обеспечило высочайшую чувствительность детектирования исследуемого соединения. Финальный выбор наиболее подходящего канала де-

тектирования для определения 2-АБФПК в биологических объектах будет осуществляться в рамках дальнейшей разработки биоаналитических методик с учетом влияния матрицы изучаемых объектов.

Заключение

Таким образом, в ходе исследований были выбраны оптимальные условия тандемного масс-спектрометрического детектирования нового биологически активного производного 2-аминопиррола, обладающего цитотоксической активностью. Показано, что при ионизации электроспреем в основном образуются ионы по типу протонированной, или депротонированной, молекулы в зависимости от режима ионизации. Путем соударительной диссоциации получены вто-

ричные масс-спектры, содержащие сигналы фрагментных ионов 2-АБФПК. Выбраны ионные пары для реализации режима мониторинга множественных реакций, который обеспечивал высокую чувствительность определения изучаемого соединения, необходимую для проведения исследований его фармакокинетики.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

Сведения об авторах статьи:

Чечёв Артур Тимурович – аспирант кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Адрес: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2. E-mail: arthurtse@yandex.ru.

Карпенко Юлия Николаевна – к.фарм.н., доцент кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Адрес: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2; ООО «Парма Клиникал». Адрес: г. Пермь, ул. Причальная, 16. Email: karpenko_pfa@mail.ru.

Тумилович Екатерина Юрьевна – к.фарм.н., доцент кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Адрес: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2; ООО «Парма Клиникал», г. Пермь, ул. Причальная, 16. Email: e.tumilovich@gmail.com.

Игидов Назим Мусабекович – д.фарм.н., профессор кафедры общей и органической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Адрес: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2. Email: igidov_nazim@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Постановление Правительства Российской Федерации от 29.12.2021 № 2544 "О внесении изменений в государственную программу Российской Федерации "Развитие фармацевтической и медицинской промышленности" [Электронный ресурс] // URL : <http://ips.pravo.gov.ru:8080/default.aspx?pn=0001202112310036> (дата обращения 20.05.22).
2. 2-Амино-1-бензамидо-5-(3,3-диметил-2-оксобутилен)-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамид, вызывающий нарушения фаз клеточного цикла и проявляющий цитотоксическую активность в отношении сарком мягких тканей и желудочно-кишечных стромальных опухолей (ГИСО) пат. № 2 765 545 Рос. Федерация № 2020133367; заявл. 12.10.20; опубл. 01.02.22, Бюл.№4. 10 с.
3. Boichuk, S. The Design, Synthesis, and Biological Activities of Pyrrole-Based Carboxamides: The Novel Tubulin Inhibitors Targeting the Colchicine-Binding Site / Boichuk, S. [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 5780. – pp. 1–27.
4. 2-Амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилен)-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамид, проявляющий цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток человека пат. № 2 753 480 Рос. Федерация № 2020130076; заявл. 14.09.20; опубл. 17.08.21, Бюл.№23. 9 с.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
6. Рейхарт, Д.В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях (обзор) / Д. В. Рейхарт, В. В. Чистяков // *Казанский медицинский журнал*. – 2010 г. – Т. 91, № 4. – С. 532 – 536.
7. Всероссийская научно-практическая онлайн-конференция международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы», посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ (Самара, 26-27 октября 2021 г.): Сборник материалов / под ред. академика Европейской Академии естественных наук, заслуженного работника высшей школы Российской Федерации, доктора фармацевтических наук, профессора В.А. Куркина. – Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2021 – С.185-190.

REFERENCES

1. Postanovlenie Pravitel'stva Rossiiskoi Federatsii ot 29.12.2021 № 2544 "O vnesenii izmenenii v gosudarstvennyuyu programmu Rossiiskoi Federatsii "Razvitie farmatsevticheskoi i meditsinskoi promyshlennosti" [Elektronnyi resurs] // URL : <http://ips.pravo.gov.ru:8080/default.aspx?pn=0001202112310036> (data obrashcheniya 20.05.22). (In Russ).
2. 2-Amino-1-benzamido-5-(3,3-dimetil-2-oksobutiliden)-4-okso-4,5-digidro-1N-pirrol-3-karboksamid, vyzyvayushchii narusheniya faz kletochного tsikla i proyavlyayushchii tsitotoksicheskuyu aktivnost' v otnoshenii sarkom myagkikh tkanei i gastrointestinal'nykh stromal'nykh opukholei (GISO) pat. № 2 765 545 Ros. Federatsiya № 2020133367; zayavl. 12.10.20; opubl. 01.02.22, Byul.№4. 10 s. (In Russ).
3. Boichuk, S. The Design, Synthesis, and Biological Activities of Pyrrole-Based Carboxamides: The Novel Tubulin Inhibitors Targeting the Colchicine-Binding Site / Boichuk, S. [et al.] // *Molecules*. 2021.; 26 (5780):1–27. (In English).
4. 2-Amino-1-(4-bromfenil)-5-(3,3-dimetil-2-oksobutiliden)-4-okso-4,5-digidro-1N-pirrol-3-karboksamid, proyavlyayushchii tsitotoksicheskuyu aktivnost' v otnoshenii opukholevykh kletok cheloveka pat. № 2 753 480 Ros. Federatsiya № 2020130076; zayavl. 14.09.20; opubl. 17.08.21, Byul.№23. 9 s. (In Russ).
5. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Ch. 1 / pod red. A.N. Mironova. – M.: Grif i K, 2012 : 944. (In Russ).
6. Reikhart, D.V. Analiz lekarstvennykh sredstv pri farmakokineticheskikh issledovaniyakh (obzor) / D. V. Reikhart, V. V. Chistyakov // *Kazanskii meditsinskii zhurnal*. 2010;91(4): 532 – 536. (In Russ).
7. Vserossiiskaya nauchno-prakticheskaya onlain-konferentsiya mezhdunarodnym uchastiem «Farmatsevticheskoe obrazovanie SamGMU. Istoriya, sovremennost', perspektivy», posvyashchennaya 50-letiyu farmatsevticheskogo obrazovaniya SamGMU (Samara, 26-27 oktyabrya 2021 g.): Sbornik materialov / Pod redaktsiei akademika Evropeiskoi Akademii estestvennykh nauk, zasluzhennogo rabotnika vysshei shkoly Rossiiskoi Federatsii, doktora farmatsevticheskikh nauk, professora V.A. Kurkina. – Samara: FGBOU VO SamGMU Minzdrava Rossii, 2021.:185-190. (In Russ).