

## Выбор оптимальных условий анализа доксазозина методом хромато-масс-спектрометрии

Е.В.Ковальская, Е.А.Мамина, С.В.Лачин

Национальный фармацевтический университет  
Харьков, Украина

Проведен выбор оптимальных условий хромато-масс-спектрального анализа доксазозина: параметров работы термостата, испарителя хроматографа, хроматографической колонки и масс-спектрометрического детектора. Выполнена идентификация доксазозина методом хромато-масс-спектрометрии по масс-спектрам и параметрам удерживания при хроматографировании. Результаты исследований могут быть рекомендованы для анализа биологических объектов на доксазозин и его метаболиты.

**Ключевые слова:** доксазозин, газовая хроматография с использованием масс-спектрометрического детектора, оптимальные условия анализа, идентификация.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время метод газовой хроматографии с масс-спектральным детектированием (ГХ/МС), как высокоспецифичный и чувствительный, широко используется для целей судебно-медицинской экспертизы и химико-токсикологических исследований неизвестных ядов, наркотических и лекарственных веществ, а также их метаболитов.

Надежность идентификации исследуемых веществ ГХ/МС-методом обусловлена использованием специфической характеристики — масс-спектров, параметров удерживания, получаемых при выполнении хроматографирования, а также проведением компьютерного поиска на основе библиотек программного обеспечения.

Учитывая сложности анализа биологических объектов на наличие токсических веществ и их метаболитов (возможность фальсификации пробы, малый объем, присутствие в пробе

ТАБЛИЦА 1

### Оптимальные параметры хромато-масс-спектрального анализа доксазозина

Параметры термостата хроматографа	
Начальная температура	70°С
Время выдержки при начальной температуре	3 мин.
Скорость подъема температуры	15°С/мин.
Конечная температура	280°С
Время выдержки при конечной температуре	11 мин.
Параметры испарителя хроматографа с программируемым температурным испарением	
Режим	с делением потока
Начальная температура	90°С
Время выдержки при начальной температуре	0,1 мин.
Скорость подъема температуры	20°С/мин.
Конечная температура	350°С
Время выдержки при конечной температуре	2 мин.
Коэффициент деления	5:1
Поток деления	7,7 см <sup>3</sup> /мин.
Общий поток	12,0 см <sup>3</sup> /мин.
Параметры хроматографической колонки	
Максимальная температура	325°С
Номинальная длина	30 м
Номинальный диаметр	250 мкм
Номинальная толщина пленки фазы	0,25 мкм
Номинальный начальный поток	1,5 см <sup>3</sup> /мин.
Средняя скорость потока	46 см/с
Параметры масс-спектрометрического детектора	
Режим настройки	автонастройка
Режим сканирования	полный спектр
Время отсечки пика растворителя	3,52 мин.
Добавка напряжения на умножителе	200 В
Суммарное напряжение на умножителе	1484,2 в
Диапазон сканирования	35-550 а.е.м.
Температура квадруполя	150°С
Температура источника	230°С

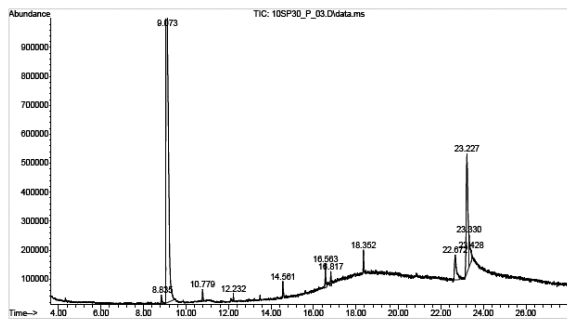


Рис. 1. Хроматограма етанольного розчину доксазозина з концентрацією 2,0 мкг/мл.

большого количества фоновых эндогенных и экзогенных веществ) для получения надежных результатов, важным является сопоставление данных предварительных и подтверждающих методов (высокоэффективная жидкостная и газожидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия) [1, 3-5].

Целью исследования был выбор оптимальных условий хромато-масс-спектрального анализа доксазозина – α1-адреноблокатора, используемого при лечении артериальной гипертензии и гипертрофии простаты [2, 6], а также проведение идентификации доксазозина по масс-спектрам и параметрам удерживания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ доксазозина методом газовой хроматографии выполнялся на хромато-масс-спектрометре Agilent 6890N/5975B Inert XL EI/CI GC/MS System с капиллярной колонкой Agilent 19091S-433 HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane.

В результате предварительных исследований были выбраны оптимальные условия работы оборудования (табл. 1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для хроматографирования были использованы растворы доксазозина в этаноле с концентрацией 2,0-5,0 мкг/мл.

В результате хроматографирования в разработанных условиях получены хроматограммы (рис. 1), по которым проводился поиск с использованием библиотек масс-спектров «Nist05 Spectra Lib» и «Wiley 7th/Nist 05 MS lib» (табл. 2).

При обработке полученных данных учитывались, как правило, результаты со значением вероятности более 70%.

На хроматограмме наблюдались пики №1, №3 и №4 – кремнийорганические соединения, продукты распада покрытия колонки. Пики №5, №6, №8 и №12 – фталаты, системные пики газохроматографического оборудования. Пик №7 идентифицирован как полиароматическое соединение 10-гидрокси-бензо[b]флуорантен, фенольный метаболит бензо[b]флуорантена.

Двум наиболее интенсивным пикам №2 и №10 соответствовали времена удерживания 9,07 мин. и 23,23 мин. Пик №2 идентифицирован как 9-Hydroxypyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one, (рис.2) и не являлся фрагментом доксазозина (рис. 2).

Пик №10 был идентифицирован как 4-Amino-6,7-dimethoxy-2-(1-piperazinyl)quinzoline и являлся фрагментом доксазозина.

Установлено, что масс-спектры доксазозина и 4-Amino-6,7-dimethoxy-2-(1-

ТАБЛИЦА 2

### Идентификация хроматографических пиков с использованием библиотек масс-спектров

№ пика	Время удерживания, мин.	Площадь пика, %	Название соединения
1	8,83	0,48	Iron, methylcarbonyl-cyclopentadienyl
2	9,07	77,11	9-Hydroxypyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one
3	10,78	0,51	Cycloheptasiloxane
4	12,23	0,27	Tetracosamethylceclododecasiloxane
5	14,56	0,17	1,2-Benzenedicarboxylic acid, methylpropyl ester
6	16,56	1,10	3-Methyl-4-methoxy-6-(3',5'-dimethyl-1',3'-hexadienyl)-2H-pyran-2-one
7	16,81	0,58	Benz[e]acephenanthrylen-10-ol
8	18,36	0,79	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester
9	22,67	3,15	Bis(5-methyl-4-oxo-3,4-dihydropyrimidinyl-2)-amine
10	23,23	13,26	4-Amino-6,7-dimethoxy-2-(1-piperazinyl)-quinzoline
11	23,33	2,22	3-Chloro-6-hydrazinopyridazine
12	23,43	0,36	2,4-D-2-ethyl hexyl ester

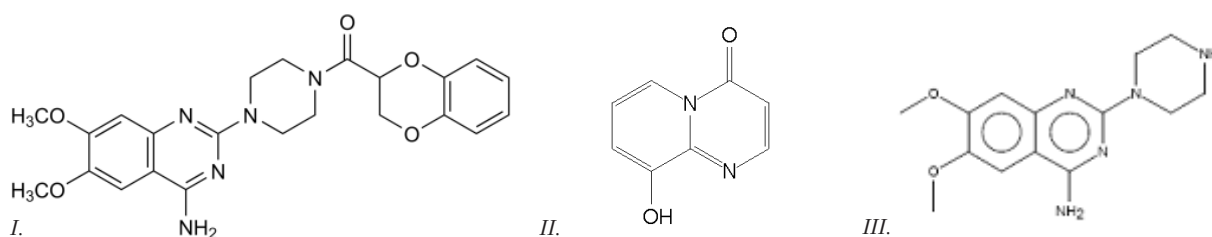


Рис. 2. Структурні формули доксазозина (I) і речовин, що відповідають пікам №2 (II) і №10 (III).

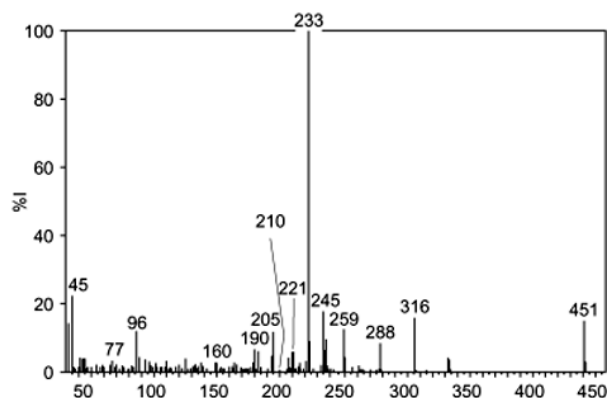


Рис. 3. Масс-спектр доксазозина.

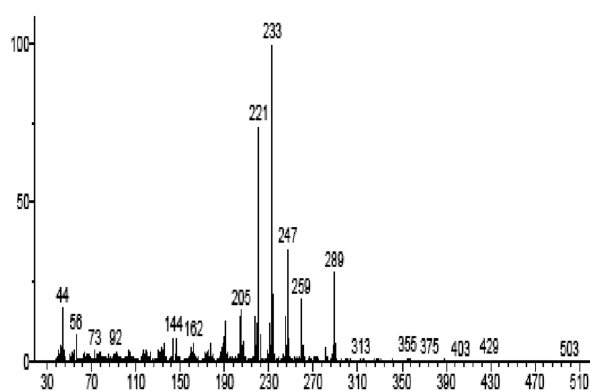


Рис. 4. Масс-спектр 4-Amino-6,7-dimethoxy-2-(1-piperazinyl)quinazoline.

piperazinyl)quinazoline мають подібний набір характерних іонів (рис. 3, 4).

Образование 4-Amino-6,7-dimethoxy-2-(1-piperazinyl)quinazoline обусловлено термическим воздействием на доксазозин в процессе газохроматографического анализа.

Для уточнения идентификации была проведена обработка полученной информации программой «NIST MS Search 2.0» с более сложным алгоритмом поиска по библиотекам масс-спектров.

По результатам поиска пики №9 и №11 могут быть также идентифицированы как Piperazine, 1-(4-amino-6,7-dimethoxy-2-quinazolinyl)-4-(2-furanylcarbonyl) (рис. 5). Учитывая плохое разделение пиков №9, №10 и №11, результаты

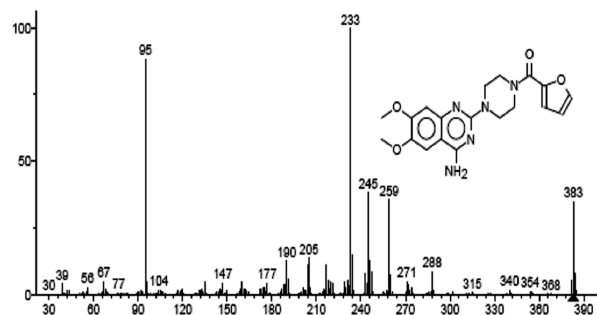


Рис. 5. Масс-спектр и структурная формула Piperazine, 1-(4-amino-6,7-dimethoxy-2-quinazolinyl)-4-(2-furanylcarbonyl).

идентификации по ним фактически относятся к одному общему пику.

Таким образом, доксазозин с использованием хромато-масс-спектрометрического анализа можно идентифицировать по пику №10 или пикам №9, №10 и №11 с соответствующими временами удерживания 22 мин. и 67 мин., 23 мин. и 23 мин., 23 мин. и 33 мин.

## ВЫВОДЫ

1. Проведен выбор оптимальных условий хромато-масс-спектрального анализа доксазозина: параметров работы термостата, испарителя хроматографа, хроматографической колонки и масс-спектрометрического детектора.

2. Выполнена идентификация доксазозина методом хромато-масс-спектрометрии по масс-спектрам и параметрам удерживания при хроматографировании. Результаты исследований могут быть рекомендованы для анализа биологических объектов на доксазозин и его метаболиты.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аналіз доксазозину ВЕРХ-методом у присутності антигіпертензивних препаратів / О.В.Ковальська, О.О.Маміна, Н.В.Гарна, І.А.Сич / Зб. наук. праць співробітн. НМАПО ім. П.Л.Шупика. — 2010. — Вип.19. — Кн.2. — С. 142-148.

2. Вишнеvский А.Е. Сосудистые эффекты  $\alpha$ 1-адреноблокаторов и их клиническое значение у больных доброкачественной гиперплазией простаты / А.Е.Вишнеvский, Н.А.Степанова, Е.В.Михайлова // Клин. фармакол. и терапия. — 2004. — Т.13. — №4. — С. 90-93.
3. A LC-MS-MS method for determination of low doxazosin concentrations in plasma after oral administration to dogs / M.Erceg, M.Cindric, F.Pozaic, L.Vertzoni // J. Chromatogr. Sci. — 2010. — Vol. 48. — №2. — P. 114-119.
4. Liu K. Enantioselective determination of doxazosin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using ovomucoid chiral stationary phase / K.Liu, D.Zhong, X.Chen // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. — 2010. — Vol. 878. — №26. — P. 2415-2420.
5. Quantification of doxazosin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry / H.Y.Ji, E.J.Park, K.C.Lee, H.S.Lee // J. Sep. Sci. — 2008. — Vol. 31. — №9. — P. 1628-1633.
6. Pharmacological exploitation of the  $\alpha$ 1-adrenoreceptor antagonist doxazosin to develop a novel class of antitumor agents that block intracellular protein kinase B/Akt activation / Yeng-Jeng Shaw, Ya-Ting Yang, J.B.Garrison, N.Kyprianou // J. Med. Chem. — 2004. — Vol. 47. — №18. — P. 4453-4462.

**О.В.Ковальська, О.О.Маміна, С.В.Лачин.**  
**Вибір оптимальних умов аналізу доксазозину методом хромато-мас-спектрометрії. Харків, Україна.**

**Ключові слова:** доксазозин, газова хроматографія з використанням мас-спектрометричного детектора, оптимальні умови аналізу, ідентифікація.

Проведено вибір оптимальних умов хромато-мас-спектрального аналізу доксазозину: параметрів роботи термостата, випарника хроматографа, хроматографічної колонки та мас-спектрометричного детектора. Виконано ідентифікацію доксазозину методом хромато-мас-спектрометрії за мас-спектрами та параметрами утримування при хроматографуванні. Результати досліджень можуть бути рекомендовані для аналізу біологічних об'єктів на доксазозин та його метаболіти.

**O.V.Kovalska, O.O.Mamina, S.V.Lachin.**  
**The choice of optimum conditions of doxazosin analysis by method chromatomass-spectrometry. Kharkiv, Ukraine.**

**Key words:** doxazosin, gas chromatography with use mass-spectrometrical detector, optimum conditions of analysis, identification.

The choice of optimum conditions of chromatomass-spectrometrical analysis doxazosin: work parameters of thermostat, evaporator chromatograph, chromatographic column and mass-spectrometric detector have been conducted. The identification of doxazosin by method of chromatomass-spectrometry on mass-specters and parameters of retention by chromatographic process have been executed. The results of investigation may be recommended for analysis of biological objects on doxazosin and his metabolites.

Надійшла до редакції 27.11.2010 р.