

УДК 543.544:546.9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОСТИ ОКСОПЛАТИНЫ (IV) МЕТОДОМ ВЭЖХ

А.В. Иванов, К.Д. Китвашвили, В.М. Иванов

(кафедра аналитической химии)

Методом ВЭЖХ на сорбенте Lichrosorb-NH₂ с использованием подвижной фазы ацетонитрил – вода (70 : 30) изучено хроматографическое поведение *цис*-диамминдихлоро-*транс*-дигидроксоплатины(IV) (оксоплатина) и исходного продукта ее синтеза *цис*-диамминдихлороплатины(II), использующихся в качестве противоопухолевых препаратов с различающейся нефротоксичностью. Показана возможность оценки индивидуальности оксоплатины.

Цис-диамминдихлоро-*транс*-дигидроксоплатина(IV) (оксоплатина, $(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{OH})_2\text{Cl}_2$) в настоящее время представляет большой интерес не столько с позиций координационной химии [1], сколько с позиций медицины, поскольку обладает высокой противоопухолевой активностью при L-1210, асцитной гепатоме 22, саркоме 180, аденокарциноме молочной железы 755 и аденокарциноме толстого кишечника АКАТОЛ при отсутствии нефротоксичности [2]. Это соединение синтезируют в несколько стадий, включающих растворение металлической платины в смеси $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$, последовательное введение KCl , гидразина, аммиака, окисление получившейся *цис*-диамминдихлороплатины(II) [*цис*-ДДП, *цис*платин, $(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2$] пероксидом водорода [3]. *Цис*платин, также вошедший в медицинскую практику лечения онкозаболеваний, проявляет сильную нефротоксичность. Поэтому актуальна как разработка методов контроля индивидуальности *цис*платина [4] и продуктов его метаболизма [5], так и индивидуальности оксоплатины и продуктов ее метаболизма [2]. Задача контроля сводится не только к оценке

чистоты конечного препарата и примесей в нем других комплексов платины, но и к определению содержания *цис*- и *транс*-изомеров, поскольку их терапевтическое действие также различно.

Анализ имеющейся литературы показал перспективность применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [4 – 8]. Важно отметить, что при определении продуктов метаболизма оксоплатины требуется сложная пробоподготовка объекта анализа (кровь, моча) [2].

Цель настоящей работы – разработка методики контроля индивидуальности оксоплатины с помощью ВЭЖХ.

Экспериментальная часть

Аппаратура и реагенты. Использовали хроматографическую систему, состоящую из насоса высокого давления “Beckman-114 M” (США), петлевого дозатора “Rheodyne-7125” (США) с объемом петли 20 мкл, хроматографических колонок (4,6 x 250 мм) с сорбентом Lichrosorb-NH₂ (США), фракция 10 мкм, УФ-детектора

“Uvicord-2238” (LKB-Bromma, Швеция) с длиной волны 281 нм или спектрофотометрического детектора “MicroUvis-204” (США) с переменной длиной волны и самописца TZ-4620 (ЧССР). В качестве подвижной фазы использовали смесь (70:30) хроматографически чистого ацетонитрила с деионированной водой (рН 4,5 – 4,7). Перед использованием подвижную фазу фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Расход подвижной фазы составлял 1 мл/мин.

Методика. Колонку уравнивали подвижной фазой ацетонитрил – вода (70:30) в течение 50 – 60 мин, вводили 5 – 20 мкл раствора исследуемого соединения (1 мг/мл) и регистрировали хроматограмму по светопоглощению элюата при 281 нм. Измеряли высоту хроматографического пика, строили градуировочный график “масса оксоплатины (мкг) – высота пика (мм)”. Содержание оксоплатины в синтезированном препарате определяли по градуировочному графику. Уравнение градуировочного графика имеет вид: $c = 0,22 h$, где h – высота пика (мм); c – концентрация оксоплатины (мг/мл) при аликвотной части 20 мкл.

Результаты и их обсуждение

Как было показано при изучении комплекса *цис*-диаминдихлороплатины(II) методом ВЭЖХ [4], при увеличении содержания ацетонитрила в смеси с водой от 70 : 30 до 90 : 10 времена удерживания также увеличиваются, хотя последовательность элюирования сохраняется. При этом диэлектрическая проницаемость среды уменьшается и составляет 49,7; 45,6 и 41,6 при соотношении компонентов 70 : 30, 80 : 20 и 90 : 10 соответственно.

В данной работе в качестве подвижной фазы выбрана смесь (70 : 30) ацетонитрил – вода (рН 4,5 – 4,7), для которой корректно измерение рН стеклянным электродом

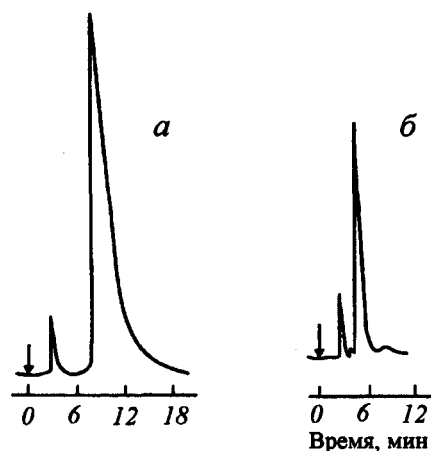


Рис. 1. Хроматограммы растворов, свежеприготовленных из индивидуальных перекристаллизованных и высушенных в сушильном шкафу препаратов: *a* – оксоплатины, *б* – *цис*-платины

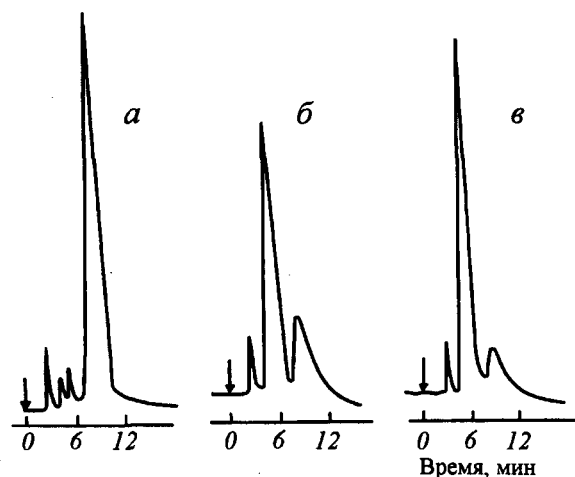


Рис. 2. Хроматограммы растворов оксоплатины (1 мг/мл): *a* – сразу после приготовления, через несколько дней после приготовления: *б* – 10, *в* – 15

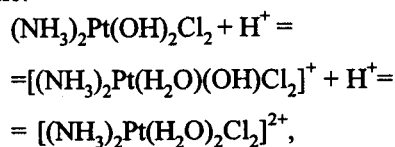
без введения поправок. При рН > 5 возможно образование смешанных гидроксохлоридных комплексов *цис*-ДДП или тригидроксохлоридных комплексов платины (IV), что значительно усложнило бы вид и интерпретацию хроматограмм. При рН < 4 преобладают процессы протонирования аминогрупп неподвижной фазы, что приводит к изменению механизма сорбции.

Хроматограмма свежеприготовленного раствора оксоплатины (перекристаллизованный препарат, высушенный до постоянной массы в сушильном шкафу) имеет два пика: $3,03 \pm 0,03$ и $8,42 \pm 0,15$ мин (рис.1, *a*). Первый малый пик мы относим к воде, второй, имеющий классический вид, – к оксоплатине. Для сравнения на этом же рисунке приведена хроматограмма свежеприготовленного раствора *цис*-ДДП (перекристаллизованный и высушенный препарат гарантированной чистоты и индивидуальности). Первый пик при $3,03 \pm 0,03$ мин можно отнести к воде, поскольку времена удерживания и высоты пиков совпадают для разных соединений при подвижной фазе одного состава, а пик при $4,15 \pm 0,05$ мин отнесен к *цис*-ДДП [4].

Хроматограммы растворов оксоплатины (рис.2), снятые через различные промежутки времени после приготовления растворов, имеют пики при $3,03 \pm 0,03$; $5,50 \pm 0,08$ и $8,42 \pm 0,15$ мин, из которых первый и последний мы относим к воде и оксоплатине соответственно; пик при $5,50 \pm 0,08$ мин не идентифицирован.

Сравнение хроматограмм (*a* – *в*) на рис.2 показывает уменьшение пика и изменение его формы при $8,42 \pm 0,15$ мин и нарастание пика, имеющего классическую форму, характерную для индивидуального соединения, при $5,50 \pm 0,08$ мин. Содержание оксоплатины через 10 – 15 сут сни-

жается до 25 – 20 % от исходного. Можно предположить, что пик при $5,50 \pm 0,08$ мин принадлежит *цис*-диамминдихлоро-*транс*-аквагидрохсоплатине(IV) либо *цис*-диамминдихлоро-*транс*-диакваплатине (IV), образующихся по схеме:



поскольку подвижная фаза имеет рН 4,5 – 4,7, а не рН > 7, при котором преобладают комплексы дигидрохсоплатины(IV). Такое объяснение не противоречит отнесению пика при $8,42 \pm 0,15$ мин к оксоплатине, которая, вероятно, удерживается неподвижной фазой за счет двух хлорогрупп и двух оксигрупп, в отличие от *цис*-ДДП, удерживаемого слабее только за счет образования комплексов двух хлорогрупп с аминогруппами на поверхности сорбента [4]. Наличие двух хлорогрупп и одной гидроксогруппы в промежуточном продукте $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})\text{Cl}_2]^+$ объясняет увеличение удерживания по сравнению с *цис*-ДДП или его уменьшение по сравнению с оксоплатиной – $(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{OH})_2\text{Cl}_2$. Важно отметить, что пики при 4,15 и 5,50 мин не перекрываются с пиком основного продукта и легко регистрируются на его фоне. В то же время пик со временем удерживания 5,50 мин маскирует пик *цис*-ДДП (4,15 мин) и тем сильнее, чем больше прошло времени между приготовлением растворов оксоплатины и регистрацией хроматограмм. Поэтому для обнаружения *цис*-ДДП в препарате оксоплатины необходимо регистрировать хроматограммы сразу после приготовления растворов.

Хроматограмма раствора, приготовленного из неперекристаллизованной оксоплатины, имела четыре пика при $3,03 \pm 0,03$; $4,15 \pm 0,05$; $5,50 \pm 0,08$ и $8,42 \pm 0,15$ мин, что указывает на присутствие в нем непрореагировавшего

исходного продукта – *цис*-ДДП ($4,15 \pm 0,05$ мин) (примерно 2 %) и небольшого количества продукта акватации оксоплатины ($5,50 \pm 0,08$ мин). Хроматограммы раствора, приготовленного из оксоплатины после ее перекристаллизации и высушивания в сушильном шкафу, имели только два пика, характерных для индивидуальной оксоплатины, при $3,03 \pm 0,03$ и $8,42 \pm 0,15$ мин. Содержание основного продукта составило 97 ± 3 % ($n = 5$). Следовательно, перекристаллизация и высушивание оксоплатины позволяют получить чистый препарат оксоплатины, не содержащий нефротоксичной *цис*-ДДП. Предел обнаружения составляет 0,03 мг/мл *цис*-ДДП при содержании оксоплатины 1 мг/мл и объеме аликвотной порции 20 мкл.

С целью изучения метаболизма оксоплатины в организме пациентов и идентификации продуктов метаболизма в дальнейшем целесообразно систематически изучать хроматографическое поведение оксоплатины с использованием подвижной фазы переменного состава, кислотности на неподвижных фазах различной природы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Желиговская Н.Н., Черняев И. И. Химия комплексных соединений. М., 1966.
2. Сингин А. С., Масько А. С., Молдаванова Л.К., Лобанова Е. А., Серебряков Н.Г. // ХФЖ. 1985. 19. № 10. С. 1046.
3. Синтез комплексных соединений металлов платиновой группы / Под ред. И.И.Черняева. М., 1964.
4. Иванов А. В., Желиговская Н. Н., Нестеренко П.Н. // ЖАХ. 1995. 50. № 2. С. 190.
5. Масько А.С., Сингин А. С., Серебряков Н. Г. // ХФЖ. 1987. 21. № 3. С. 262.
6. Dolezal P., Kourilova D., Krejci M. // J. Microcol. Sep. 1990. 2. № 5. P. 241.
7. Kizu R., Miyazaki M. // Bunseki Kagaku. 1990. 39. № 6. P. 371.
8. Алимарин И. П., Басова Е.М., Большова Т. А., Иванов В. М. // ЖАХ. 1986. 41. № 1. С. 5.

Поступила в редакцию 25.06.96