

**Анализ нелетучих и термолабильных сильнодействующих лекарственных веществ в крови и плазме методом ВЭЖХ с масс-селективным детектором.**

*ЧОКБ, г. Челябинск*

*БСМЭ, г. Челябинск*

В настоящее время хроматографические методы занимают доминирующее положение в анализе сложных многокомпонентных смесей органических соединений. В большой группе хроматографических процессов в качестве подвижной фазы используются жидкости. Применение жидкостей для этой цели имеет ряд преимуществ: жидкие подвижные фазы обладают высокой растворяющей способностью в широком диапазоне температур между температурой их затвердевания и точкой кипения. Они способны растворять и переносить через хроматографическую колонку при комнатной температуре такие вещества, которые не переходят в газообразное состояние вследствие их высокой молекулярной массы, очень малой упругости пара или недостаточной устойчивости при повышенных температурах [1]. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) принадлежит к числу наиболее распространенных методов аналитической химии [2]. Комбинация ВЭЖХ с масс-селективным детектором открыла новые возможности, в частности в анализе биологических объектов на лекарственные вещества и токсические компоненты.

В последние годы в мировой медицинской литературе опубликовано большое количество методик анализа, предназначенных для лекарственного и токсикологического мониторинга, как правило, одного или группы подобных лекарственных веществ. Однако, методик для токсикологического скрининга в литературе практически не встречается. Это связано с особенностями масс-спектрометрии, сопряженной с ВЭЖХ. В частности, невозможностью создания библиотек стандартных масс-спектров из-за влияние матрицы, растворителей, способов и параметров ионизации на масс-спектр. Для каждого вещества и условий хроматографирования приходится подбирать условия ионизации для обеспечения высокой чувствительности анализа. Однако, собрав большую базу данных по анализу чистых препаратов методом ВЭЖХ-МС мы предприняли попытку подобрать условия хроматографирования и ионизации, обеспечивающие приемлемую чувствительность для широкого круга лекарственных веществ и некоторых потенциальных токсикантов.

Для нелетучих и термолабильных лекарственных веществ, наиболее часто встречающихся в экспертизах и токсикологических анализах была разработана методика обнаружения и качественного определения в плазме и цельной крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектором (LC-MS), предназначенная для токсикологического, терапевтического мониторинга и судебно-химических исследований.

### *Материалы и методы исследования.*

*Оборудование.* Жидкостной хроматограф 1200 с диодно-матричным с масс-селективным детекторами фирмы «Agilent Technologies», предколонка 2,1\*12,5 мкл с сорбентом SB-C<sub>8</sub> 5 мкм и хроматографическая колонка Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2,5 мм и размером частиц фазы C<sub>18</sub> 5 мкм. Для управления хроматографом и обработки хроматограмм использовали программное обеспечение ChemStation G2710BA версии В. 03.01. В работе использовали также аппарат для встряхивания АБУ-6с, центрифуга на 3000-5000 об/мин, иономер И-130, компрессор воздушный KB-1, весы аналитические ВЛР-200, бытовой холодильник с морозильным отделением, набор пипеток – дозаторов фирмы Biohit.

В качестве стандартов анализируемых веществ использовали метаноловые экстракты из соответствующих лекарственных средств или ГСО.

Для исследований и отработки методики использовали плазму или трупную кровь, проверенную на отсутствие лекарственных, психотропных и наркотических веществ. До анализа образцы холостой и анализируемой крови хранили в морозильной камере при температуре минус 12°C. Подготовку крови проводили по следующей методике: к 2 мл крови добавлялись 50 мкл этанолового раствора внутреннего стандарта (циклизина – 0,04 г/л), 1 мл аммиачного буфера (рН=9,2), 100 мг хлорида натрия и 8 мл хлороформа. Содержимое встряхивали 10 мин и центрифугировали при 4000 об/мин 5 мин. Органический слой отделяли и фильтровали через безводный сульфат натрия во флакон. Органическую фазу выпаривали в потоке воздуха при 40°C до объема 0,5 мл, переносили в виалу для автосамплера и выпаривали. К сухому остатку добавляли 300 мкл смеси метанол : 0,05М буферный раствор ацетата аммония с рН=3,8 (1:9) и 10 мкл полученного раствора исследовали методом ВЭЖХ-МС.

### *Хроматографический анализ.*

Образцы анализировали на жидкостном хроматографе при следующих условия анализа: температура колонки 40°C, элюенты – 0,05М буферный раствор ацетата аммония с рН=3,8 (А) и метанол (В), скорость подачи элюента 0,25 мл/мин, градиентный режим: в течение 15 мин поток элюента В меняется от 10% до 80%, а к 25 минуте он достигает 94%, выдержка в течение 5 минут при 94% элюента В и регенерация колонки в течение 5 мин смесью, содержащей 90% элюента А. Объем вводимой пробы 10 мкл. Диодно-матричный детектор работал с регистрацией УФ спектра от 210 до 400 нм и аналитическими длинами волн 230 и 280 нм. Масс-спектрометрический детектор работал в режиме химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). Поток азота в источнике ионов 5 л/мин, давление на небулайзере 20 psi, температура осушающего газа 350°C, испарителя 250°C, напряжение на капилляре 2000 вольт, ток коронного разряда 4 мка, Gain=10, напряжение на фрагменторе 70 вольт. Режим SIM с регистрацией положительных и отрицательных ионов, характерных для анализируемых веществ. В таблице 1 приведены времена удерживания и характеристические ионы веществ, для которых построены калибровочные кривые. Для автоматического обнаружения пиков анализируемых веществ программой

хроматографа эти вещества разделены на группы, три группы с положительными ионами и одна с отрицательными. В одну группу не входят вещества с близкими временами удерживания, а для увеличения чувствительности в каждой группе выделены по времени фрагменты для съемки не более 3-4 ионов одновременно.

Таблица 1

Характерные ионы и времена удерживания для ряда определяемых веществ

t удерж	Название	М масса	1 (+)	2(+)	3(+)	4(-)
4,34	Cimetidine	252,4			253,2	
4,19	Atenolol	266,3	267,2			
6,12	Tiapride	328,2			329,2	
8,94	Clonidine	230,1		232		
10,44	Metoclopramide	299,8	300,2			
10,91	Azafen	297,2		298,2		
11,54	Zopiclone	388,8	389			
12,91	Afobazol	307,2		308,2		
14,38	Pyroxan	337,2	338,2			
14,91	Propranolol	259,2			260,2	
15,75	Pyrazidol	226,2		227,2		
15,75	Cyclizine	266,4			267,2	
16,09	Haloperidol	375,2		376,2		
16,40	Tianeptine	436,5	437			
18,07	Nifedipine	346,3			315	
18,50	Tofizopam	382,2		383,2		
19,03	Phenazepam	349,0	349			
19,45	Warfarin	308,2				307,2
20,11	Trifluoperazine	407,5			408,2	
27,25	Brodifacoum	523,2				521,2

#### *Результаты и их обсуждение.*

В качестве внутреннего стандарта для анализа был выбран циклизин (Cyclizine), так как в настоящее время в России он не используется, потому вероятность его присутствия в анализируемых образцах минимальна. При используемых условиях извлечения анализируемых веществ из крови (плазмы) в экстракты, в основном, извлекаются вещества, имеющие основные свойства, и амфолиты, в меньшей степени извлекаются вещества, имеющие кислотные свойства. Поэтому пределы обнаружения (ПрО) веществ основного характера, как правило, ниже 0,1 мкг/мл, а ПрО веществ кислого характера выше этого значения. В настоящее время проводятся исследования по расширению круга регистрируемых данной методикой веществ и метрологическая оценка их определения. Стандартная обработка хроматограмм, предусмотренная программным обеспечением ChemStation G2710BA, не позволяет бесконечно расширять круг анализируемых веществ, так как пики фиксируются по общему ионному току. Однако для самого метода ВЭЖХ-МС не обязательно даже качественное разделение пиков на хроматограмме, так как всегда есть возможность получить хроматограммы по выборочным ионам и произвести их обработку. Модифика-

ция программного обеспечения для целей скрининга позволяет расширить количество регистрируемых соединений до 80-100. Однако, надо понимать, что расширение круга веществ ведет к уменьшению времени регистрации каждого конкретного иона, а значит, к потере чувствительности метода. В настоящее время количественный анализ проводится по 19 веществам, еще 28 веществ качественно регистрируются в крови, в том числе дигидролазин, изониазид, альфа-аманитин, эналаприлат, ципрофлоксацин, баклафен, циклопенталат, вальпроевая кислота и другие вещества, определение которых в крови методом ГХ-МС невозможно или требует специальных методик. Для примера на рисунке приведена хроматограмма экстракта плазмы крови для веществ обладающих основными свойствами и амфолитов с концентрацией 1 мкг/мл.

Описанная методика в настоящее время применяется для расширения круга определяемых токсикантов при судебно-химических анализах в Челябинском областном бюро судебно-медицинской экспертизы, а также для токсикологических анализов в Челябинском областном токсикологическом центре, когда скрининг экстрактов методом ГХ-МС крови дает отрицательный результат.

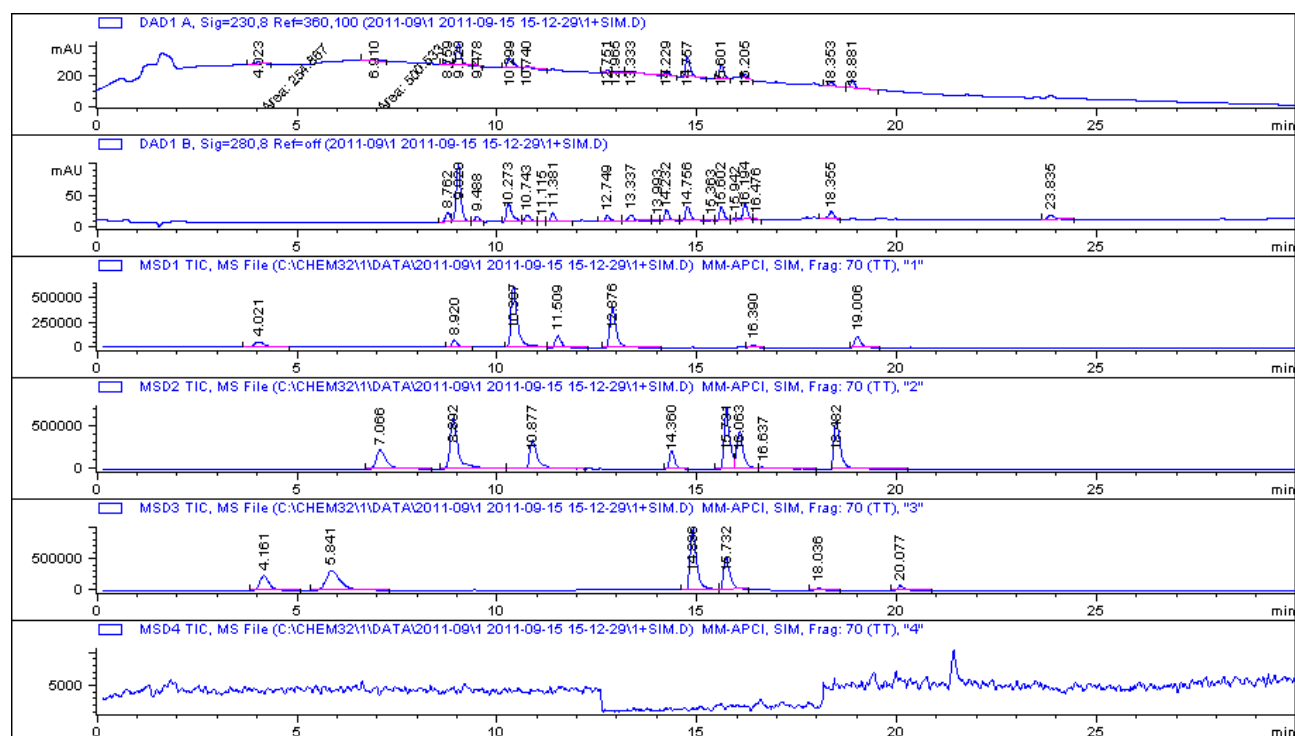


Рис.1. Хроматограмма экстракта плазмы крови по протонированным молекулярным ионам, содержащей по 1 мкг/мл определяемых веществ. По оси абсцисс - время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала масс-селективного детектора.

#### Литература.

1. Химико-аналитическое определение наркотиков и допинговых средств / Руденко Б.А., Коваленко А.Е., Галузин К.А., Руденко Г.И., Кардонский Д.А., Гришин Д.А., Еганов А.А. – М.: Издательский дом «Нарконет», 2007. – 368 с.
2. Растворители для ВЭЖХ / П. Садек; Пер. с англ. Горбатенко А.А. и Ревинной Е.И. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 704 с.: ил.