

ПРИМЕНЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОНЛАЙН- ТФЭ-ВЭЖХ-МС/МС-СИСТЕМЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВОГО МЕТОДА АНАЛИЗА

Л.Галактионова, к.х.н., компания "Элемент"
element@usp.ru

Определение лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях организма требует использования высокоселективных и чувствительных методов анализа. В последние годы для этих целей наиболее широко используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с tandemной масс-спектрометрией. Анализируемые таким методом образцы крови, плазмы, мочи и пр. всегда представляют собой многокомпонентные смеси, содержащие значительное количество затрудняющих определение интерферирующих компонентов. В статье представлен обзор методов подготовки проб к МС/МС-анализу. Показаны преимущества автоматических систем пробоподготовки на основе онлайн-ТФЭ. Приводится пример эффективной технологии разработки нового метода анализа хинаприла и его метаболитов на автоматической онлайн-ТФЭ-ВЭЖХ-МС/МС-системе. Новый метод отличается высокой достоверностью и воспроизводимостью получаемых результатов.

Состояния, связанные с повышением артериального давления, – одна из наиболее актуальных проблем здравоохранения. По данным [1], страдают артериальной гипертонией (АГ) 26% от общей численности населения, а к 2025 году эксперты прогнозируют увеличение доли больных до 29,2%. По мнению авторов статьи, если в 2000 году АГ страдали 972 млн. человек, то к 2025 году эта цифра возрастет на 60% и составит уже 1,56 млрд. человек. При этом зачастую АГ протекает бессимптомно, приводя к развитию опасных осложнений: инфаркта миокарда, инсульта, хронической сердечной недостаточности. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента применяются в кардиологии, начиная с семидесятых годов прошлого столетия, а сегодня прочно занимают позицию препаратов первого ряда для лечения артериальной гипертонии [2]. К таким препаратам относятся: каптоприл, эналаприл, лизиноприл, фозиноприл, хинаприл, рамиприл, тран-

долаприл. Их клинический эффект обусловлен подавлением активности ангиотензинпревращающего фермента и, как следствие, уменьшением образования ангиотензина II из ангиотензина I в тканях и циркулирующей крови. Уменьшение концентрации ангиотензина II, в свою очередь, приводит к снижению периферического сосудистого сопротивления, систолического и диастолического артериального давления, повышению сердечного выброса, уменьшению пост- и пред нагрузки на миокард [3].

МЕТОДЫ ПОДГОТОВКИ ПРОБЫ К МС-АНАЛИЗУ

Масс-спектрометрия – наиболее совершенный современный инструментальный метод анализа сложных органических соединений, содержащихся в биологических жидкостях. При этом на достоверность получаемых результатов большое влияние оказывают качество и воспроизво-

димость предварительной подготовки образца. Ниже приводится краткое описание распространенных методов пробоподготовки для массспектрометрии.

Осаждение (высаливание) белка. Этот метод является классическим, наиболее простым и доступным, однако он обладает рядом недостатков, во многих случаях ограничивающих его применение, таких как низкая селективность (возможно соосаждение, "захват" осадком целевых компонентов), необходимость проведения дополнительных стадий центрифугирования и фильтрации. Кроме того, денатурированные белки с массой менее 5000 Да зачастую остаются в супернатанте [4].

Жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ). Достоинством этого вида пробоподготовки можно назвать относительную простоту выполнения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании (как, например, в случае твердофазной экстракции), использование доступных растворителей [5]. Однако метод не лишен недостатков, это: ограниченность числа доступных растворителей; сложность разработки и автоматизации метода; в большинстве случаев требуется дополнительная стадия испарения; образующиеся в ходе экстракции эмульсии могут приводить к уменьшению степени извлечения целевого компонента.

Системы ВЭЖХ с переключением колонок. В данном методе используются хорошо известные решения жидкостной хроматографии, процесс подготовки пробы протекает с использованием предколонок в полностью автоматическом режиме, возможно проведение пробоподготовки

параллельно с МС-детектированием. К недостаткам этого метода можно отнести: наличие перекрестного загрязнения (даже при условии регенерации предколонки); ограниченный выбор стационарных фаз; сложность обслуживания и высокий риск выхода системы из строя.

Твердофазная экстракция (ТФЭ). Наиболее селективный метод проведения предварительной подготовки образца. Проведение процесса ТФЭ в онлайн-режиме имеет ряд преимуществ по сравнению с офлайн-ТФЭ, таких как:

- перенос аналита напрямую в аналитическую колонку без промежуточных стадий, что позволяет получать более высокие значения степеней извлечения;
- постоянство скорости потока растворителя и объема анализируемой пробы и, как следствие, высокая воспроизводимость анализа;
- возможность проведения процесса пробоподготовки параллельно с МС-детектированием в полностью автоматическом режиме, что сокращает время одного анализа и сроки разработки нового метода.

В статье описана разработка нового метода анализа хинаприла, хинаприлата и гидрохлортиазида (ГХТ) методом ВЭЖХ, совмещенного с tandemным масс-спектрометром. Структурная формула хинаприла представлена на рис.1.

ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

Подготовку образца перед анализом проводили на автоматической системе ТФЭ Symbiosis Pharma производства Spark Holland, Нидерланды (рис.2).

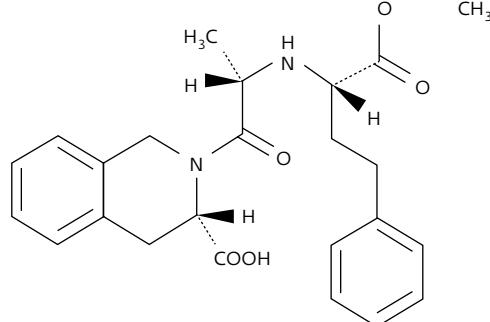


Рис.1. Структурная формула хинаприла



Рис.2. Система автоматизированной пробоподготовки Symbiosis Pharma

Система имеет специальный режим работы, направленный на разработку нового метода анализа (AMD - Advanced Method Development).

В состав системы входят:

- автосамплер Reliance;
- сдвоенный насосный модуль (диспенсер) для подачи растворителей (HPD);
- устройство автоматической смены картриджей, снабженное пневматическими захватами (ACE);
- два насоса высокого давления со встроенным дегазатором;
- программное обеспечение для управления системой сбора данных .

Для подбора условий ТФЭ использовали сменные картриджи HySphere 2×10 мм, заполненные различными обращенофазными сорбентами (размер частиц <10 мкм). Размещение картриджей в специальном блоке Method Development Tray (восемь рядов различных картриджей по 12 штук одного типа в каждом ряду) позволяет осуществлять последовательный скрининг в автоматическом режиме (рис.3).

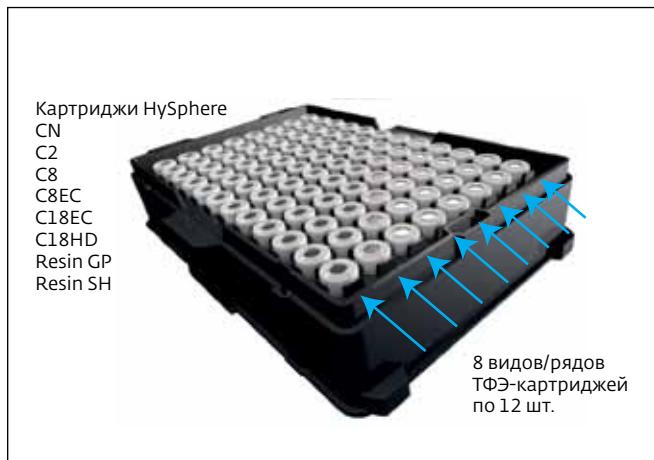


Рис.3. Набор картриджей Method Development Tray для разработки нового метода анализа

Эффективность сорбентов оценивали по степени извлечения целевых компонентов (хинаприла, хинаприлата, гидрохлортиазида) из плазмы крови новорожденного теленка.

Результаты оценки эффективности сорбентов представлены на хроматограммах (рис.4 и 5). Для хинаприла и хинаприлата высокая степень извлечения была достигнута на шести из представленных сорбентов: C2, C8, C8(EC), C18, C18HD, Resin GP, при этом наилучшие результаты получены на сорбенте C18HD. Для неполярного соеди-

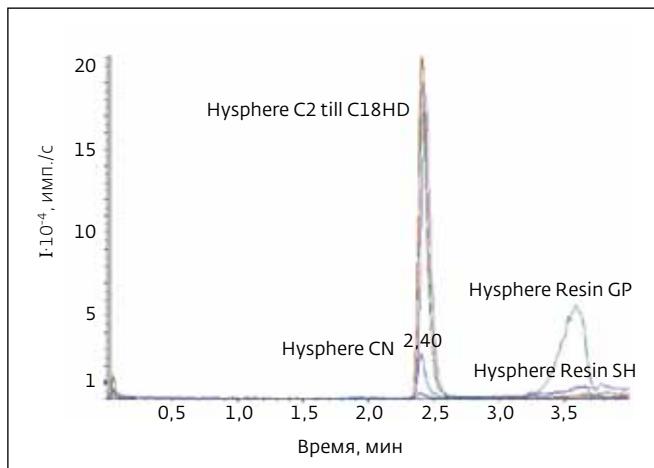


Рис.4. Хроматограмма хинаприла, полученная с использованием гидрофобных сорбентов HySphere

нения – гидрохлортиазида – максимальная степень извлечения получена при использовании сорбента Resin GP (табл.1). Следовательно, для того чтобы эффективно экстрагировать все три целевых соединения, необходимо использовать систему, содержащую два последовательно размещенных ТФЭ-картриджа.

При проведении анализа картридж ТФЭ с фазой C18HD размещали в левом держателе блока смены картриджей (ACE), а с фазой Resin GP – в правом. Элюирование целевых компонентов в аналитическую колонку и далее на МС-детектор происходило последовательно: сначала с картриджа Resin GP – в течение 2,5 мин, затем с картриджа C18HD – также в течение 2,5 мин. Схема онлайн-ТФЭ-системы приведена на рис.6.

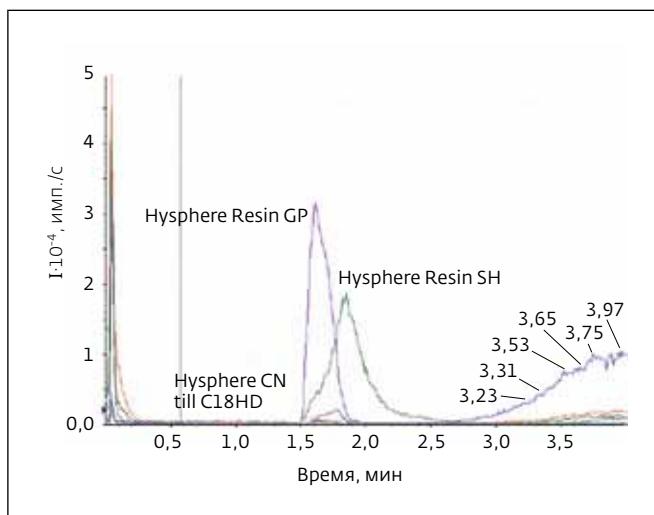


Рис.5. Хроматограмма гидрохлортиазида, полученная с использованием гидрофобных сорбентов HySphere

Таблица 1. Степень извлечения целевых компонентов из сыворотки крови теленка в сравнении с чистыми веществами (мобильная фаза 5% АЦН + 0,1% FA)

Наименование образца	Хина-прил, %	Хина-прилат, %	ГХТ, %
Прямая инжекция	100	100	100
Наименование/фаза ТФЭ-картриджа	CN-Acid	12,2	18,2
	C2-Acid	93,9	10,1
	C8-Acid	93,7	92,4
	C8(EC)-Acid	87,2	90,3
	C18-Acid	84,8	91,3
	C18HD-Acid	96,1	96,6
	Resin GP-Acid	73,7	89,4
	SH-Acid	10,9	10,4
			51,4

Параметры дозирования (автосамплер)

Пробу объемом 50 мкл вводили через петлевой инжектор при температуре 6°C. Промывку проводили с использованием двух промывочных растворов:

- раствор 1 – 50% АЦН с 1% триэтиламина (ТЭА), pH=11,0 объемом 700 и 1500 мкл;
- раствор 2 – 90% АЦН объемом 700 мкл.

Параметры проведения ТФЭ

Картридж 1 10×2 мм C18HD

Картридж 2 10×2 мм HySphere GP

Сольватация 2 мл АЦН, 4 мл/мин

Установление равновесия... 2 мл 5% АЦН в 0,1% FA,

4 мл/мин

Загрузка образца 1 мл 5% АЦН в 0,1% FA,

2 мл/мин

Промывка..... 1 мл 5% АЦН в 0,1% FA, 5 мл/мин

Промывка клапана 1 мл 10% АЦН, 5 мл/мин

Элюирование Градиентное, 1 мин

Параметры проведения ВЭЖХ-анализа

Аналитическая колонка Waters Xterra MS
C18 3,5 мкм 50×4,6 мм

Мобильная фаза А 5 мМ Формиата аммония,
pH=3,5

Мобильная фаза Б Метанол

Поток 5 мин, 1 мл/мин

Время установления равновесия
между инжекциями 30 с

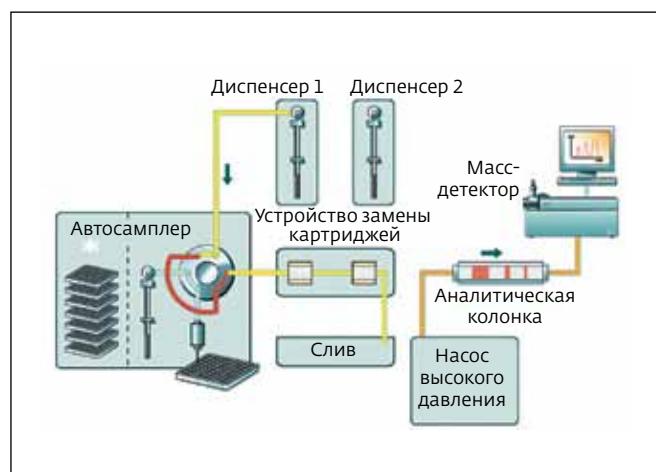


Рис.6. Схема автоматической онлайн-ТФЭ-системы

Параметры МС-детектирования

Для идентификации компонентов, совместно с системой Symbiosis Pharma может работать масс-спектрометр любой фирмы-производителя. Исследование проводили с использованием API 3000 фирмы ABSciex с ионизацией электроспреем (режим регистрации отрицательных ионов).

В качестве внутреннего стандарта для хинаприла и хинаприлата был использован беназеприл, и гидрофторметиазид (ГФТ) – для гидрохлортиазида (ГХТ).

МС-детектирование компонентов происходило дважды с разницей в 2,5 мин: сначала гидрохлортиазид и соответствующий внутренний стандарт, затем хинаприл и хинаприлат и соответствующий внутренний стандарт (табл.2, 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проанализирована серия образцов с различной концентрацией плазмы, взятой у новорожденных.

Таблица 2. Условия создания градиента

Время, мин:сек	Скорость потока, мл/мин	Фаза А, %	Фаза Б, %
00:00	1,0	50	50
01:00	1,0	10	90
01:30	1,0	10	90
01:45	1,0	50	50
02:30	1,0	50	50

Таблица 3. Параметры масс-спектрометра (NEB=15, CUR=10, IS=-4200, TEM=400, CAD=400)

Аналит	Хинаприл	Хинаприлат	Беназеприл	ГХТ	ГФТ
Квадруполь Q1	437,26	409,25	423,24	296,05	330,07
Квадруполь Q2	391,10	175,70	174,10	205	238,90
Время задержки	150	150	150	150	150

рожденного теленка. В качестве внутреннего стандарта использовали беназеприл и гидрофторметиазид (ГФТ).

Калибровочные стандарты брали в концентрациях: 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 и 2000 нг/мл. В контрольных пробах концентрация анализов составляла: 10, 100 и 1000 нг/мл. Стандарт для оценки воспроизводимости: концентрация, 200 нг/мл. Полученные хроматограммы приведены на рис.7.

На рис.8 приведены хроматограммы, иллюстрирующие перекрестное загрязнение при введении в систему чистого элюента.

Значение перекрестного загрязнения системы для каждого из целевых компонентов не превышает сотых долей процента, что свидетельствует о его пренебрежимо малом вкладе

в получаемые значения концентраций анализов (см. рис.8).

Линейность, достоверность

и воспроизводимость измерений

Калибровочные зависимости (рис.9а-9в) строили по результатам трех параллельных измерений для каждого из анализируемых образцов (табл.4) в диапазоне концентраций от 2 до 2000 нг/мл. Точность аппроксимации $R^2 = 0,999$ для хинаприла и хинаприлата, и 0,996 для гидрохлортиазида. В соответствии с методикой выполнения анализа, качество полученных результатов определяли концентрации целевых компонентов оценивали при введении контрольных образцов с концентрациями 10, 100 и 1000 нг/мл. В табл.5 приведены данные по анализу контрольных проб при шести параллельных измерениях.

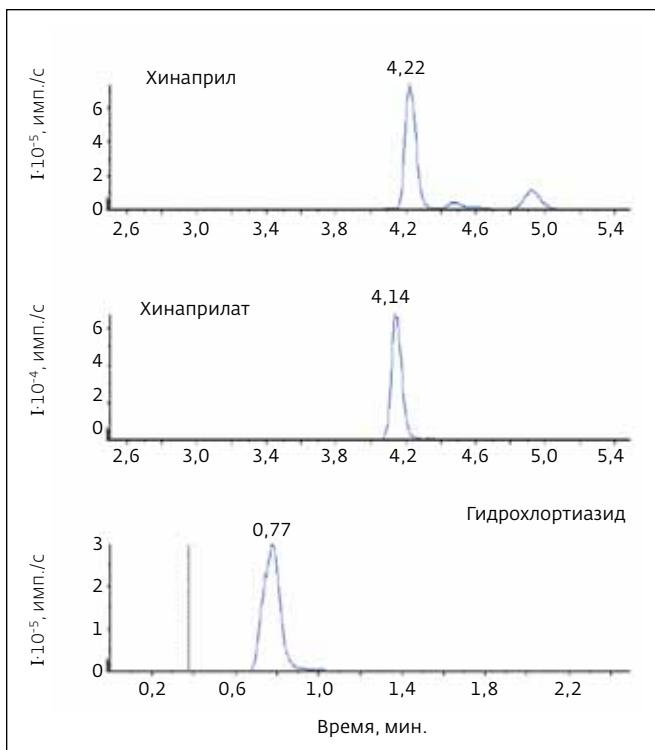


Рис.7. Хроматограмма образца плазмы, концентрация 2000 нг/мл, объем инъекции 50 мл

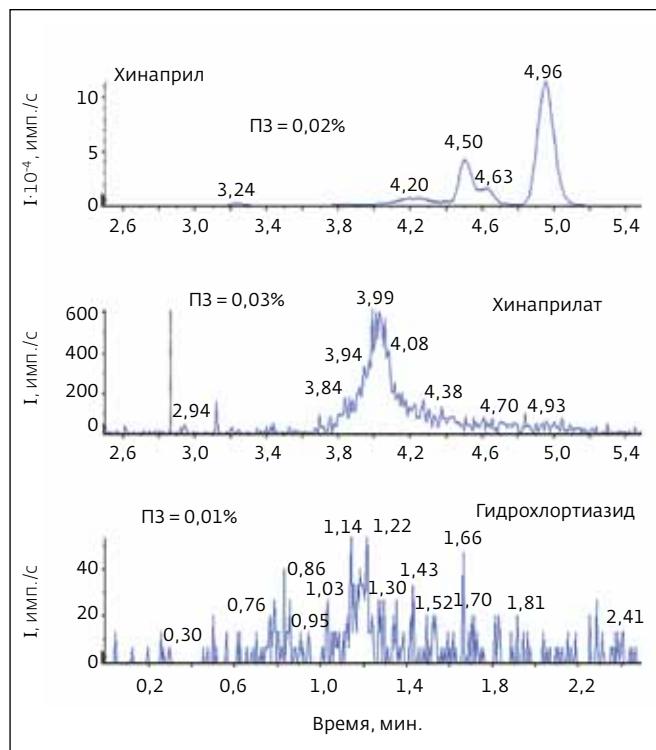


Рис.8. Перекрестное загрязнение (ПЗ) системы после введения 2000 нг/мл образца

Таблица 4. Оценка стандартного отклонения и достоверность полученных результатов при построении калибровочных зависимостей хинаприла, хинаприлата и гидрохлортиазида ($n=3$)

Концентрация, нг/мл	Наименование определяемого вещества					
	Хинаприл		Хинаприлат		Гидрохлортиазид	
	Стандартное отклонение (CV), %	Достоверность, %	Стандартное отклонение (CV), %	Достоверность, %	Стандартное отклонение (CV), %	Достоверность, %
2	11,3	116			6,34	102
5	8,70	97,9	1,78	97,3	7,59	91,0
10	3,12	96,3	0,24	95,4	11,5	93,6
20	3,89	90,1	2,28	97,8	4,22	97,9
50	10,8	95,8	1,45	107	10,1	102
100	9,73	97,8	1,81	104	5,32	107
200	4,99	100	0,78	96,1	1,54	104
500	1,39	109	1,65	106	9,11	103
1000	1,39	95	0,69	93,5	6,27	101
2000	2,63	100	1,35	101	13,3	98,0

Воспроизводимость результатов

Воспроизводимость полученных результатов оценивали путем определения концентрации целевых компонентов (хинаприла, хинаприлата и гидрохлортиазида) при последовательном вве-

дении 50 образцов плазмы. Концентрация каждого из анализов составляла 200 нг/мл. При этом значение стандартного отклонения при $n=50$ для хинаприла составило 4,53 %, для хинаприлата – 1,34%, для гидрохлортиазида – 11,23%.

Таблица 5. Оценка стандартного отклонения и достоверность полученных результатов для контрольных образцов хинаприла, хинаприлата и гидрохлортиазида (n=6)

Определяемое вещество	Параметр	Концентрация контрольного образца, нг/мл		
		10	100	1000
Хинаприл	Стандартное отклонение (CV), %	9,14	4,10	1,63
	Достоверность, %	102	102	97,9
Хинаприлат	Стандартное отклонение (CV), %	1,87	2,15	1,37
	Достоверность, %	96,9	103	97,8
Гидрохлортиазид	Стандартное отклонение (CV), %	2,01	2,31	1,43
	Достоверность, %	97,6	102	99,3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье приведен пример разработки нового метода анализа хинаприла и его метаболитов в сыворотке крови в течение 1,5 дней с использованием системы Symbiosis Pharma. Исследованы образцы, содержащие целевые компоненты в диапазоне концентраций от 2 до 2000 нг/мл (точность

аппроксимации получаемых калибровочных кривых составляет для хинаприла и хинаприлата 0,999%, для гидрохлортиазида - 0,996%), достоверность получаемых результатов находится в диапазоне от 91 до 116 %.

Надежность разработанного метода подтверждается исследованиями воспроизводимости анализа при 50 последовательных инжекциях, стандартное отклонение (CV) при этом составило <5%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kearney P. M. et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. – Lancet, 2005, v.365, p.217–223.
2. Снежицкий В.А. Фармакотерапия в кардиологии: пособие для врачей. – Гродно: ГрГМУ, 2009.
3. Агеев Ф.Т., Смирнова М.Д., Кадушина Е.Б. Свободная или фиксированная комбинации эналаприла и гидрохлортиазида в реальной амбулаторной практике: что лучше для больного артериальной гипертонией? Сравнение эффективности и приверженности к лечению. – Кардиология, 2008, №5, с.10–15.
4. Calderoli S., Frigerion E., James C.A. Comparison of protein precipitation, turbulent flow and automated on-line solid phase extraction, as plasma sample preparation techniques for the determination of compound I by LC-MS-MS. – Chromatographia, 2004, v.59, p.183–186.
5. Петров Б.И. Жидкость-жидкостная экстракция: вчера, сегодня, завтра. – Химия, т.4, №8, с.184–191.
6. Lopez de Alda M.J., Barcelo D. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. – Journal of Chromatography A, 2001, v.938, p.145–153.

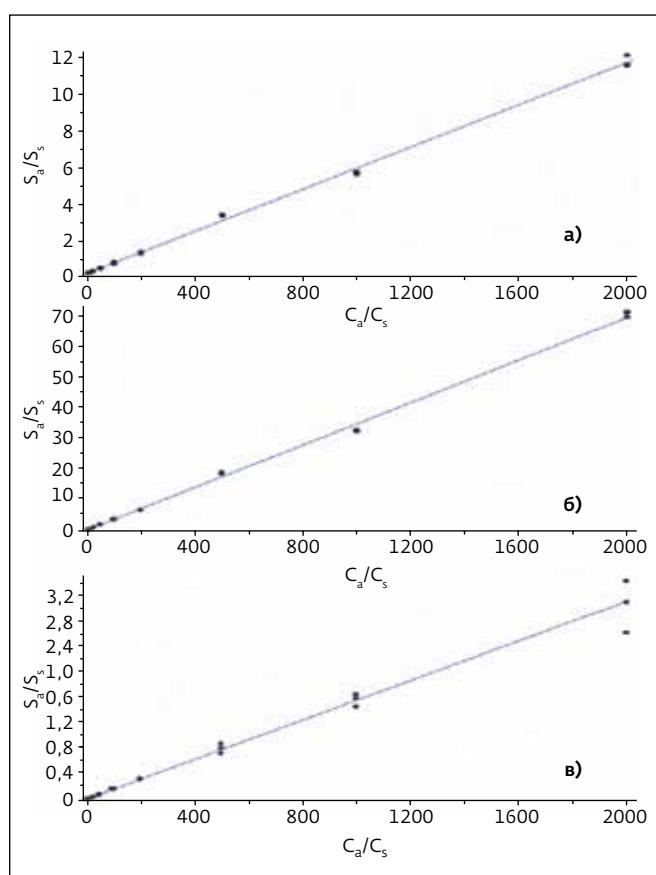


Рис.9. Зависимость отношения площади пика хинаприла (а), хинаприлата (б) и гидрохлортиазида (в) к площади пика внутреннего стандарта S_a/S_s от отношения их концентраций C_a/C_s

Компания Аквилон представляет Атомно-абсорбционный спектрометр А-2

Атомно-абсорбционный спектрометр А-2 – современный автоматизированный прибор, предназначенный для проведения атомно-абсорбционного анализа как в пламенном, так и в электротермическом режиме. Сочетание в атомно-абсорбционном спектрометре А-2 двух способов атомизации, быстрое переключение из одного режима в другой отвечает требованиям действующей нормативной базы контрольно-аналитических лабораторий, которая подразумевает наличие двух типов приборов для проведения анализов, при этом расходы на приобретение и эксплуатацию оборудования значительно сокращаются.



Пламенные атомизаторы разработаны для работы со смесями: ацетилен – воздух; ацетилен – закись азота; пропан-бутановая смесь – воздух. Прибор управляет с помощью персонального компьютера с операционной системой Microsoft Windows. Настройка длины волн, процедура поиска пика, регулировка ширины спектральной щели, переключение спектральных ламп, регулировка высоты и положения атомизаторов выполняются в автоматическом режиме. Для различных режимов измерения в программном обеспечении имеются наборы предварительно настроенных параметров, которые могут быть перенастроены пользователем в соответствии с методическими указаниями для проведения конкретного анализа. Эти изменения можно записать в файл (так же, как и калибровочные кривые) и при необходимости вызвать заново. Переключение между пламенным и электротермическим атомизаторами выполняется автоматически. Метод измерения основан на селективном поглощении электромагнитного излучения атомами определяемого элемента в газовой фазе.

А-2 может быть использован для проведения исследований практически в любых лабораториях, это:

- система государственного контроля и надзора;
- пищевая промышленность;
- экология;
- медицина и фармакология;
- геология и горнодобывающая промышленность;
- металлургия;
- целлюлозно-бумажная промышленность;
- химическая и нефтехимическая промышленность;
- производство минеральных удобрений;
- криминалистика и судебно-медицинская экспертиза;

- научные исследования;
- биотехнология
- и многие другие области.

Основные объекты анализа

В режиме пламенной атомизации:

- природные и сточные воды;
 - атмосферный воздух и воздух рабочей зоны;
 - почвы и донные отложения;
 - стали и сплавы;
 - биологические объекты.
- В режиме электротермической атомизации:
- питьевые и природные воды;
 - атмосферный воздух;
 - почвы и донные отложения;
 - пищевые продукты (зерно и зернопродукты, рыба, яйца, молоко и молочные продукты, продукция масложировой и мясоперерабатывающей отраслей);
 - комбикорма;
 - алкогольная продукция;
 - стали и сплавы;
 - биологические объекты, в том числе: цельная кровь, сыворотка крови, волосы, ногти, ткани печени.

Некоторые примеры решаемых задач:

- определение концентрации Fe, Mn, Co, Cu, Zn, Ni, K, Na, Ca, Mg в пробах природных и сточных вод;
- определение концентрации Ag, Al, As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, V, Zn в пробах питьевой воды;
- определение концентрации Cd, Cu, Co, Cr, Mn, Ni, Fe, Sn, Se, Pb, Zn в пробах пищевых продуктов;

мясе рыбе, субпродуктах, колбасе и колбасных изделиях, яйцах и молочных продуктах;
• определение концентрации Cd, Cu, Pb, Mn, Ni, Co, As, Hg, Cr, Zn, Sb в почвах и донных отложениях.

К преимуществам прибора можно отнести некоторые технические решения, реализованные как в конструкции самого спектрометра, так и в дополнительном оборудовании. Например,

- быстрая смена атомизаторов (3 мин);
- устройство автоматической смены ламп револьверного типа (турель) на восемь позиций;
- автоматический контроль установки длины волны и интенсивности источника излучения;
- автоматическая установка и изменение ширины выделяемого спектрального интервала («ширины щели»);
- применение двух способов коррекции неселективного поглощения: дейтериевая коррекция и коррекция по методу Смита-Хифти;
- возможность установки устройств автоматического ввода (автосамплеров);
- возможность установки ртутно-гидридной приставки.

Специализированный автосамплер предназначен для работы с атомно-абсорбционным спектрометром А-2. Он имеет возможность автоматически отбирать стандартные растворы, анализируемые пробы, вводить химические модификаторы и вспомогательные растворы при работе AAC в режиме электротермической атомизации. Также он поддерживает ввод проб в пламенный атомизатор.

Характеристики в электротермическом режиме:

- в лоток для образцов устанавливается до 76 виал (10 – для стандартных растворов, 60 – для анализируемых образцов и 6 – для матричных модификаторов);
- емкость виал для образца или стандартного раствора: 1,5 мл;
- емкость виал для модификатора: 12 мл;
- воспроизводимость – менее 2%;
- функция разбавления: максимальный множитель в случае разбавления равен 120, при этом линейность составляет не менее 0,995;
- функция ввода модификатора;
- функция встreichивания образца;
- функция защиты при понижении давления: если давление аргона понизится до 0,2 МПа, отключается промывка и на дисплей ПК выводится сообщение об ошибке.

Характеристики в пламенном режиме:

- в лоток для образцов устанавливается до 38 виал (6 – для стандартных растворов, 32 – для анализируемых образцов);
- емкость виалы для образца: 6 мл;
- емкость виалы для стандартного раствора: 12 мл;
- воспроизводимость: для меди (Cu) – менее 0,6% (пламя: ацетилен – воздух);
- воспроизводимость: для меди (Cu) – менее 1,0% (пламя: пропан-бутановая смесь – воздух);
- воспроизводимость: для бария (Ba) – менее 1,0% (пламя: ацетилен – закись азота);
- функция защиты при понижении давления: если давление аргона понизится до 0,2 МПа, отключается промывка и на дисплей ПК выводится сообщение об ошибке.

119991, г.Москва, 5-й Донской проезд, д.15, стр.2
тел./факс: (495) 925-7221, (495) 925-7220

www.akvilon.su
akvilon@akvilon.su