

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В МЕДИЦИНЕ. ЧАСТЬ 1.

Федорова Г.А., к.х.н., с.н.с., Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск, Россия, fgalina@mail.ru;

Кожанова Л.А., к.х.н., ведущий специалист, ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск, Россия, kozhanova@econova.nsk.ru;

Полянская Е. М., аспирант, Институт катализа СО РАН, г. Новосибирск, Россия.

Аннотация. Показаны преимущества унифицированных, экономичных и экспрессных методик анализа биологических жидкостей с использованием микроколоночной жидкостной хроматографии для целей терапевтического лекарственного мониторинга и фармакокинетических исследований.

Ключевые слова: ВЭЖХ, микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография, терапевтический лекарственный мониторинг, фармакокинетические исследования, анализ лекарств и их метаболитов в биологических жидкостях.

ВВЕДЕНИЕ

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является одним из самых мощных методов аналитической химии, применяемых во всех развитых странах мира в различных областях медицины:

- для проведения терапевтического лекарственного мониторинга и фармакокинетических исследований с целью определения индивидуальной схемы дозировки препаратов и контроля качества лечебных и реабилитационных процедур;
- для диагностики ряда заболеваний (определение различных метаболитов в биологических образцах);
- для контроля качества биологически активных добавок к продуктам питания;
- для контроля качества лекарственных средств.

Все перечисленные области применения ВЭЖХ хорошо согласуются с целями и задачами нового профилактического направления - восстановительной медицины. Однако активное применение ВЭЖХ в повседневной практике ограничено следующими причинами:

- необходимостью использования дорогостоящей аппаратуры и расходных материалов (колонок, элюенты);
- отсутствием унифицированных методик анализа и квалифицированных специалистов.

Несмотря на существование большого разнообразия вариантов ВЭЖХ, в настоящее время в клинической практике используется вариант обычной хроматографии с колонкой размером $\varnothing 4,6 \times 250$ мм, заполненной обращенно - фазовым сорбентом, с расходом элюента 1-2 мл/мин, давлением 15-30 МПа. Переход к микроколонке размером $\varnothing 2 \times 75$ мм позволяет не только значительно снизить стоимость расходных материалов (дорогостоящих сорбентов для колонок и элюентов), но и получить целый ряд дополнительных преимуществ [1]:

- уменьшить время анализа в 3 раза;
- уменьшить расход растворителей в 10-20 раз;
- повысить чувствительность анализа в 10-20 раз, что одновременно снижает требования к чистоте растворителей;
- уменьшить рабочее давление на колонке в 3 раза, что снижает требования к хроматографическому оборудованию.

Цель первой части статьи – показать пути решения сложных медицинских задач из области терапевтического лекарственного мониторинга и фармакокинетических

исследований с помощью метода микроколоночной жидкостной хроматографии с использованием многоканального детектирования и градиентного режима элюирования.

Применение микроколоночной жидкостной хроматографии для целей диагностики заболеваний, а также для контроля качества пищевых биодобавок и анализа лекарственных средств с помощью базы данных будет рассмотрено во второй части статьи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали микроколоночный жидкостный хроматограф "Милихром А-02" (ЗАО ИХ "ЭкоНова", Новосибирск, Россия) с колонками размером $\varnothing 2 \times 75$ мм, заполненными сорбентами Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel, Германия), ProntoSIL 120-5 C18 AQ (Bishoff, Германия).

Для приготовления элюентов и обработки проб использовали ацетонитрил 1 сорта (ACN) и гексан (Криохром, Санкт-Петербург), трифторуксусную кислоту (Sigma, США), уксусную кислоту, трихлоруксусную кислоту, фосфорную кислоту, ацетат аммония, октилсульфонат натрия, перхлорат лития, все реактивы квалификации не ниже "х.ч.", бидистиллированную воду.

В качестве стандартных (контрольных) веществ были использованы фармацевтические субстанции лекарственных веществ с содержанием основного вещества не ниже 98%.

Плазму и сыворотку крови получали стандартными способами, затем сразу анализировали или хранили до анализа при -20°C .

Условия хроматографического определения веществ приведены в тексте или в подписях к рисункам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фармакокинетические исследования необходимы при разработке новых препаратов, их лекарственных форм, при экспериментальных и клинических испытаниях лекарственных средств. На основании данных о фармакокинетике того или иного препарата определяют дозы, оптимальный путь введения, схему применения и продолжительность лечения. **Терапевтический лекарственный мониторинг** — контроль концентрации лекарственного вещества и/или его метаболитов в организме пациента в течение всего периода лечения - позволяет оптимизировать индивидуальную дозировку лекарств, которая необходима для предотвращения побочных эффектов и повышения эффективности терапии.

Развитие фармакокинетических исследований стало возможным благодаря внедрению в практику современных методов определения лекарственных веществ (ЛВ) в биологических жидкостях, таких, как высокоспецифичный, универсальный, чувствительный метод ВЭЖХ. Этот метод позволяет одновременно определять несколько соединений, отличается достаточной точностью и воспроизводимостью, легко автоматизируется.

Однако активное внедрение ВЭЖХ в рутинную клиническую практику ограничено из-за отсутствия унифицированных методик анализа. В настоящее время для определения каждого ЛВ применяется своя процедура подготовки пробы и своя методика ВЭЖХ - анализа, которые в каждом случае требуют использования колонок с разными сорбентами, разных элюентов и детекторов. Очевидно, что эти обстоятельства приводят к увеличению продолжительности всего анализа, требуют высокой квалификации персонала и существенно повышают стоимость анализа.

Один из возможных путей решения этой проблемы – разработка максимально унифицированных, экономичных и экспрессных методик одновременного определения больших групп ЛВ. В рамках единой унифицированной методики все вещества хроматографируются на одной и той же колонке с обращенно-фазовым (ОФ) сорбентом типа "С18", с использованием одной и той же двухкомпонентной подвижной фазы, состоящей из водного буферного раствора и ацетонитрила.

Масштаб хроматографии и другие рабочие характеристики микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром А-02": наличие в составе хроматографа микроколоники размером $\varnothing 2 \times 75$ мм, градиентного насоса, позволяющего формировать бинарный градиент концентраций элюентов практически любой заданной формы, многоканального ультрафиолетового (УФ) детектора с возможностью одновременного детектирования на 8 длинах волн – являются наиболее оптимальными для создания унифицированных методик анализа для рутинной клинической практики.

В качестве примера таких унифицированных методик для микроколоночного хроматографа "Милихром А-02" нами были разработаны и апробированы в клинической практике следующие:

- методика определения восьми ЛВ, часто применяемых для лечения детей: метотрексат (MTX) и противосудорожные препараты (ПСП) - этосуксимид, гексамидин, фенobarбитал, бензонал, ламиктал, дифенин, карбамазепин [2];
- методика определения основных противотуберкулезных препаратов и их метаболитов: первая группа – рифампицин (RIF), изониазид (INH), пиразинамид (PZA) [3], вторая группа – изониазид, ацетилизониазид (AcINH), пиразинамид, пиразиновая кислота (PA).

Метотрексат, применяемый при химиотерапевтическом лечении онкологических заболеваний у детей, и противосудорожные препараты, применяемые для лечения эпилепсии, выбраны в качестве объектов для унифицированной методики по причине близких значений их терапевтической и токсической концентраций. Именно это обстоятельство делает необходимым мониторинг этих ЛВ при проведении терапии. Особенно это важно при лечении детей, т.к. дозировка сильнодействующих лекарств, выбираемая, исходя из веса больного, в большинстве случаев не может обеспечить "правильную" концентрацию ЛВ в крови.

Изониазид, пиразинамид и рифампицин - препараты, наиболее часто применяемые в комплексной терапии туберкулеза. Они обладают хорошей эффективностью, но оказывают значительное токсическое воздействие на организм. Изониазид метаболизируется в печени до ацетилизониазида, который не проявляет антитуберкулезной активности. По ацетилирующей способности все люди делятся на быстрых и медленных ацетиляторов. Определение типа ацетилирования очень важно, так как у медленных ацетиляторов могут развиваться осложнения при приеме изониазида, а у быстрых ацетиляторов терапия может быть неэффективной. Основным метаболитом пиразинамида является пиразиновая кислота, которая ингибирует экскрецию мочевой кислоты, что ведет к гиперурикемии. Поэтому для оптимизации комплексной терапии туберкулеза необходимо контролировать концентрацию в крови как основных противотуберкулезных ЛВ, так и их активных и неактивных метаболитов. Это позволит достигнуть максимальной терапевтической эффективности и минимизировать побочные эффекты.

Подготовка сыворотки крови для хроматографического анализа. Показано, что при прямом введении сыворотки крови в колонку с обращенной фазой присутствующие в ней белки, липиды и некоторые другие компоненты вызывают заметное уменьшение эффективности колонки, а осаждение этих веществ на поверхности сорбента и на фильтрах колонки резко повышает ее гидродинамическое сопротивление [4]. Современные методы подготовки биологических проб для анализа направлены либо на удаление мешающих компонентов (экстракция липидов, осаждение белков) с последующим анализом супернатанта, либо на извлечение определяемого вещества из биологической матрицы (методы экстракции). Осаждение белков проводят добавлением к пробе органических растворителей, неорганических солей или сильных кислот, липиды, как правило, извлекают гексаном. Наиболее общая стандартная схема подготовки биопроб для ВЭЖХ - анализа показана на рис. 1. Для конкретных лекарственных соединений она может быть модифицирована в зависимости от природы определяемых веществ и решаемой задачи.

При осаждении белков важным параметром является консистенция образующегося осадка, который требуется количественно отделить от раствора. Для получения после центрифугирования достаточно уплотненного осадка авторы работы [5] использовали раствор перхлората лития в ацетонитриле, содержащий 1% уксусной кислоты. При выборе концентрации перхлората лития критерием уплотненности осадка была прозрачность надосадочной жидкости при слабом встряхивании центрифужной пробирки. Концентрация перхлората лития 0,3 М в пробе оказалась достаточной для получения плотного осадка.

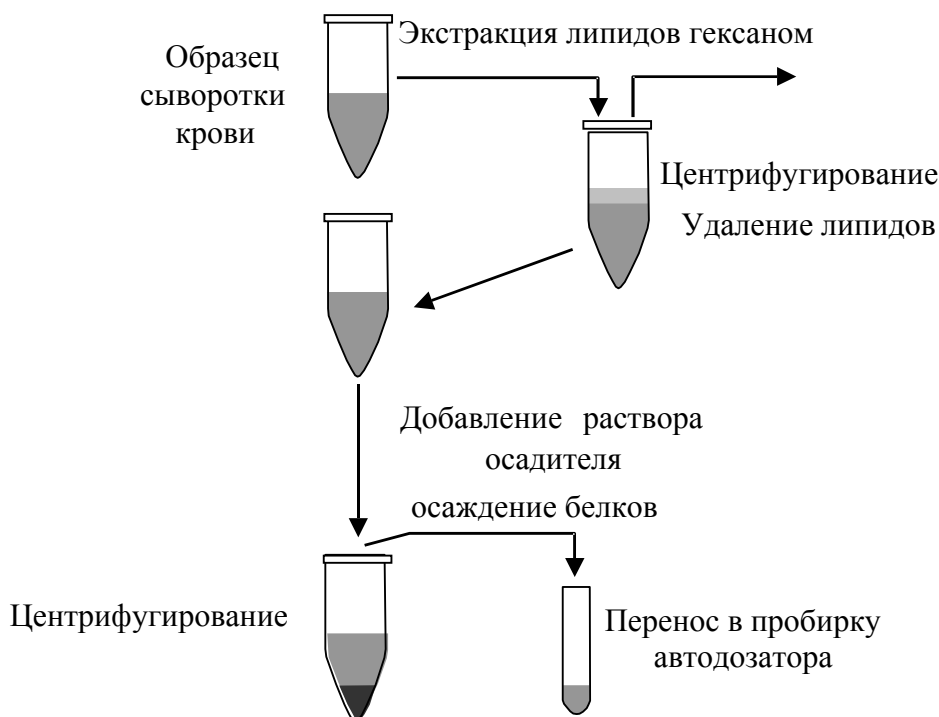


Рис. 1. Стандартная схема подготовки пробы для ВЭЖХ анализа лекарственных веществ.

Осадитель белков с добавлением перхлората лития применялся при подготовке пробы для унифицированной методики определения восьми лекарственных веществ, метотрексата и ПСП [2]. Подготовка пробы проводилась по следующей схеме:

Отделение липидов. Отделение высокогидрофобных соединений сыворотки крови от целевых компонентов проводили экстракцией гексаном, для чего к сыворотке крови приливали гексан в соотношении 1:5 по объему, встряхивали в течение 5 мин, центрифугировали для разделения слоев, гексановый слой отбрасывали, а сыворотку использовали для дальнейшей работы.

Осаждение белков. После отделения высокогидрофобных соединений к сыворотке крови добавляли осадитель (0,6 М раствор перхлората лития в ацетонитриле, содержащем 1% уксусной кислоты) в соотношении 1:1 по объему. После центрифугирования 5 - 20 мкл прозрачного верхнего слоя (супернатанта) инжестрировали в хроматограф.

Для унифицированной методики определения противотуберкулезных препаратов и их основных метаболитов – INH, AcINH, PZA, PA, RIF - подготовка пробы состояла только в осаждении белков по следующим схемам [3]:

Для определения INH, AcINH, PZA, PA. К 200 мкл анализируемой сыворотки крови добавляли 100 мкл 10% трихлоруксусной кислоты, интенсивно перемешивали 1 мин на микровстряхивателе. После центрифугирования 10 - 20 мкл супернатанта инжестрировали в хроматограф.

Для определения RIF. К 100 мкл анализируемой сыворотки крови с добавлением аскорбиновой кислоты (2 мг/мл сыворотки) приливали 200 мкл ацетонитрила, интенсивно

перемешивали 1 мин. на микровстряхивателе. После центрифугирования 10 - 20 мкл супернатанта инжектировали в хроматограф.

Режим элюирования. Анализ ЛВ в биологических жидкостях предполагает определение, как правило, одного, двух или более соединений. Если определяемые вещества не слишком различаются между собой по удерживанию, обычно удается подобрать такую подвижную фазу, которая позволяет осуществить разделение нескольких веществ за приемлемое время в изократическом режиме (при постоянном составе элюента).

В случае одновременного определения сильно различающихся по полярности соединений изократическое элюирование становится нецелесообразным. В таких случаях используют градиентное элюирование, когда сила элюента (концентрация органического растворителя) в процессе элюирования повышается. Форма градиента подбирается в соответствии с желательным временем и степенью разделения веществ.

Градиентное элюирование является универсальным подходом к разделению веществ, так как оно позволяет полностью удалять из колонки сильноудерживаемые компоненты и оптимизировать степень и время разделения одновременно многих ЛВ. С помощью градиента часто удается также повысить чувствительность определения вещества в несколько раз за счет уменьшения ширины и увеличения высоты хроматографического пика. Использование градиентного элюирования дает возможность подбирать хроматографические системы, единые для больших групп ЛВ с различной полярностью.

Для иллюстрации разделяющей способности градиентной ВЭЖХ на рис. 2 показана хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента для случая комплексной терапии. Условия элюирования ПСП были следующие: колонка – Nucleosil 100-5 C18, 2x75 мм. Элюенты: А - 0.2 М LiClO₄ - Н₃РO₄, рН 3; Б - АСN. Градиент: 2000 мкл от 10 до 30%Б, линейный. Скорость потока - 150 мкл/мин, температура - 55°С.

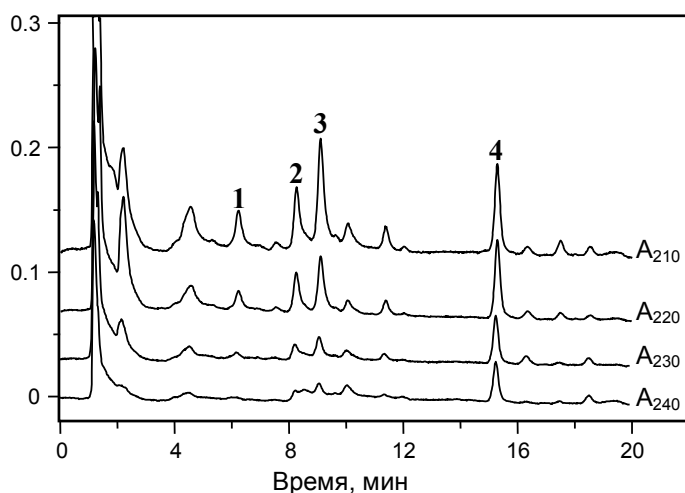


Рис. 2. Хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента для случая комплексной терапии. Суточная доза: гексамидин - 400 мг, ламиктал - 50 мг, карбамазепин - 600 мг.

Проба: обработанная сыворотка крови. Объем пробы 5 мкл.

1 – гексамидин (14,7 мкг/мл); 2 – фенобарбитал (21,0 мкг/мл);

3 – ламиктал (1,8 мкг/мл); 4 – карбамазепин (8,0 мкг/мл).

При мониторинге метотрексата градиентный режим применяли для увеличения чувствительности определения [6]. В градиентном режиме по сравнению с изократическим она повышается в три раза (рис. 3).

Противотуберкулезные ЛВ определяли на колонке, упакованной сорбентом ProntoSIL 120-5 C18, 2x75 мм, условия элюирования были следующие:

- Для 1-ой группы ЛВ (INH, PZA, RIF). Предобразец: 10 мкл 1М (NH₄)₂HPO₄ (рН 6,5). Элюенты: А - 0,01М (NH₄)₂HPO₄, рН 6,5; Б - АСN. Градиент для INH и PZA: 1200 мкл от 5 до 80% Б, линейный. Градиент для RIF: 1100 мкл от 30 до 80% Б, линейный. Общие условия: скорость потока – 150 мкл/мин, температура - 35°C, объем пробы – 10 мкл. [3].
- Для 2-ой группы ЛВ (INH, АсINH, PZA, РА). Элюенты: А - 0,1% трифторуксусная кислота, 0,4% октилсульфонат натрия, рН 2,2; Б - АСN. Градиент: 2000 мкл от 1 до 60%Б, линейный, 800 мкл - 100%Б. Скорость потока – 150 мкл/мин, температура - 40°C, объем пробы – 20 мкл.

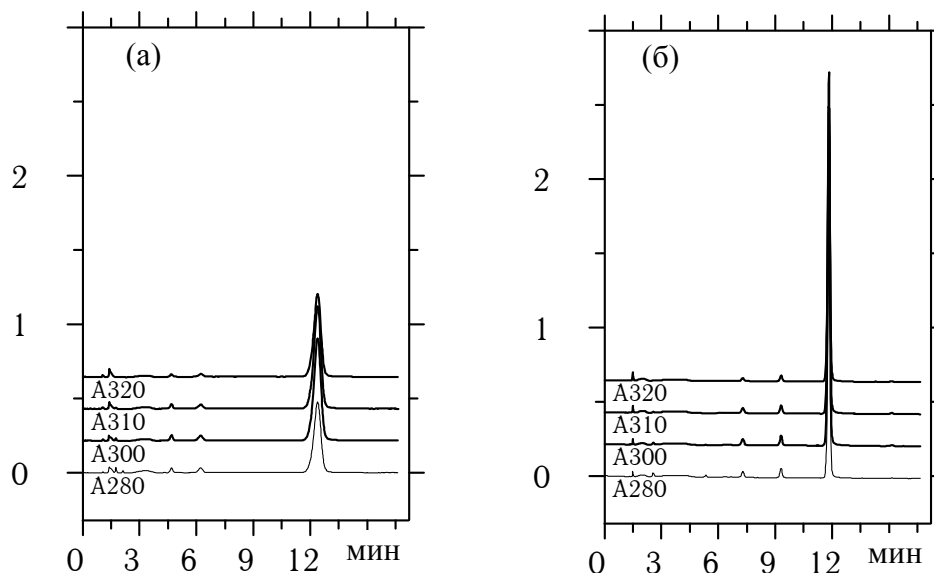


Рис. 3. Хроматограммы метотрексата при (а) - изократическом и (б) - градиентном элюировании.

(а) – 10% Б; (б) – линейный градиент: 2200 мкл от 5% до 20% Б; 500 мкл 20%Б.

Колонка: Nucleosil 100-5 C18, 2 x 75 мм.

Элюенты: А- 0.2 М LiClO₄ - Н₃РO₄, рН 3; Б- АСN

Скорость потока: 150 мкл/мин.

Температура: 40 °С.

Проба: 2 мкл водного раствора МТХ (0,5 мг/мл).

Распространенный прием для повышения удерживания гидрофильных веществ, слабо удерживаемых на обращенной фазе (к ним относятся INH и АсINH) - использование режима ион -парной хроматографии. Для этого в водно - органическую подвижную фазу вводят молекулы, имеющие гидрофобную органическую часть и заряженную группу. Гидрофобная часть молекулы сорбируется материалом неподвижной фазы обращенно - фазовой колонки, а заряженная группа служит для образования ионной пары с противоположно заряженными анализируемыми компонентами пробы в подвижной фазе.

В качестве ион - парного реагента мы использовали отрицательно заряженный октилсульфонат натрия, что позволило существенно увеличить времена удерживания INH и АсINH, положительно заряженных при рН 2,2. При этом значении рН разделяемые вещества имеют разный заряд: INH – +2 (константы ионизации, рK_а = 3,5; 10,8), АсINH - +1 (рK_а около 3,5), PZA не имеет заряда (рK_а = 0,5). Столь значительное различие в химических свойствах анализируемых ЛВ позволило оптимизировать их разделение друг с другом и с другими компонентами пробы, что показано на рис. 4, где приведена хроматограмма обработанной

сыворотки крови пациента, содержащая два противотуберкулезных ЛВ и два их основных метаболита, а также другие эндогенные компоненты сыворотки.

Режим детектирования. В ВЭЖХ-анализе ЛВ наибольшее распространение получили фотометрические (ФМ) детекторы, так как практически все эти вещества способны поглощать свет. К достоинствам ФМ детекторов можно отнести достаточно высокую чувствительность (10^{-8} - 10^{-9} г вещества в пробе) и большой линейный диапазон.

ФМ детектор с перестраиваемой длиной волны (спектрофотометр) является самым распространенным при анализе ЛВ. Как правило, детектирование проводят на длине волны, соответствующей максимальному поглощению ($\lambda_{\text{макс}}$). Когда $\lambda_{\text{макс}}$ лежит в области коротких длин волн (200 - 220 нм), могут возникать проблемы, связанные с мешающим поглощением веществ матрицы (например, сыворотки крови) и примесей в растворителях. Детектирование в длинноволновой области УФ спектра тогда предпочтительнее, даже несмотря на некоторое снижение чувствительности, так как при этом уменьшается число пиков на хроматограмме за счет исключения пиков непоглощающих в этой области спектра соединений.

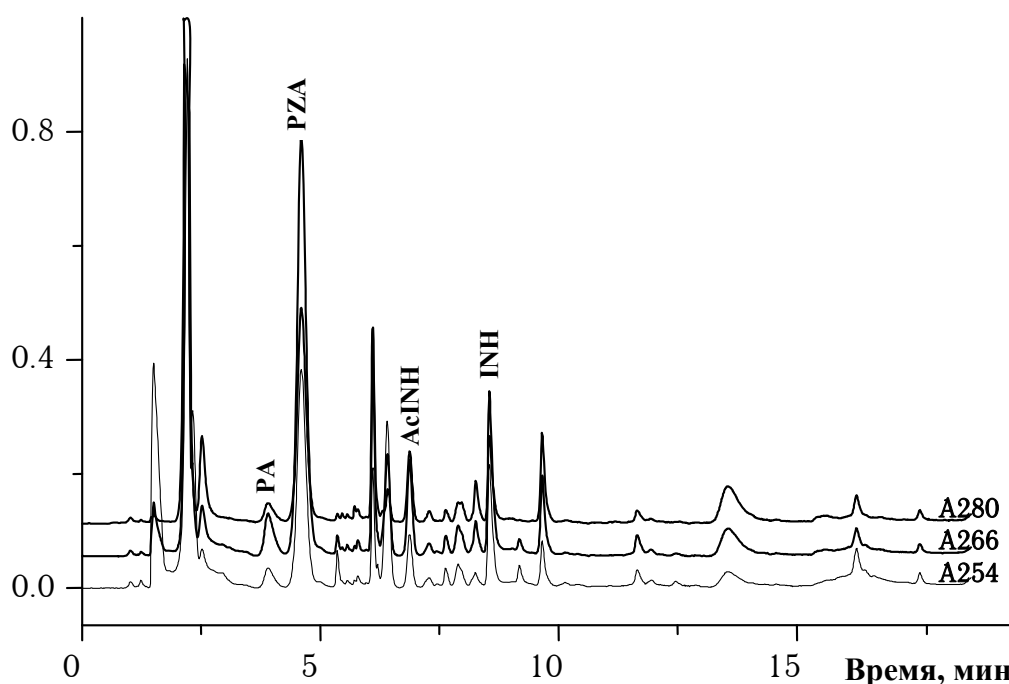


Рис. 4. Хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента, содержащая противотуберкулезные препараты и их метаболиты: PA - 3,9 мкг/мл, PZA - 31,7 мкг/мл, AcINH - 7,0 мкг/мл, INH - 10,1 мкг/мл.

Большая часть изучаемых ПСП поглощает только в области коротких длин волн, поэтому в качестве базовой длины волны для них была выбрана длина волны 210 нм, близкая к длине волны максимального поглощения. Для метотрексата и противотуберкулезных ЛВ, имеющих вторые максимумы в средней и длинноволновой части спектра, в качестве базовых были выбраны длины волн в диапазоне 254–300 нм. Длины волн максимального поглощения и детектирования приведены в табл. 1.

Выбранные нами базовые длины волн позволяют определять каждое из исследуемых соединений на оптимальной длине волны. Дополнительные длины волн используются для расчета спектральных отношений (R) - отношений площадей пиков на разных длинах волн к площади пика на базовой длине волны. Вычисление спектральных отношений производится по программе "МультиХром" (ЗАО "Амперсенд", Москва).

Использование для идентификации ЛВ в дополнение к объемам удерживания спектральных отношений существенно повышает надежность идентификации, особенно для

хроматограмм с большим числом пиков (рис. 4). В табл. 2 приведены спектральные отношения и объемы удерживания для пиразинамида и его основного метаболита пиразиновой кислоты, имеющих похожие спектры поглощения. Из таблицы видно, что R определяются с очень маленьким доверительным интервалом и поэтому, несмотря на близость объемов удерживания PZA и PA, даже небольшие различия в спектральных отношениях позволяют идентифицировать их с высокой надежностью.

Таблица 1.

Длины волн максимального поглощения (λ_{\max}) и детектирования ($\lambda_{\text{дет}}$) определяемых ЛВ и их метаболитов. Базовая длина волны подчеркнута.

Определяемое соединение	λ_{\max} , нм	$\lambda_{\text{дет}}$, нм
Фенобарбитал	194	<u>210</u> , 220, 230, 240
Карбамазепин	214, 284	<u>210</u> , 220, 230, 240
Гексамидин	194	<u>210</u> , 220, 230, 240
Ламиктал	212, 266	<u>210</u> , 220, 230, 240
Дифенин	198	<u>210</u> , 220, 230, 240
Этосуксимид	196	<u>196</u> , 200, 210, 220
Метотрексат	202, 304	280, <u>300</u> , 310, 320
Изониазид	210, 266	254, <u>266</u> , 280, 310
Ацетилизониазид	212, 266	254, <u>266</u> , 280, 310
Пиразинамид	210, 268, 310	254, <u>266</u> , 280, 310
Пиразиновая кислота	208, 268, 310	254, <u>266</u> , 280, 310
Рифампицин	236, 254, 336	<u>254</u> , 320, 336, 360

Таблица 2.

Спектральные отношения ($A_{\lambda 1}/A_{\lambda 2}$) и объемы удерживания пиразинамида и пиразиновой кислоты.

Вещество	Уровни концентрации, мкг/мл	Спектральные отношения ($x \pm 2*S$)			Объем удерживания, мкл ($x \pm 2*S$)
		A_{254}/A_{266}	A_{280}/A_{266}	A_{310}/A_{266}	
Пиразиновая кислота	5	0,48 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,08 ± 0,03	594 ± 33
	10	0,49 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,08 ± 0,01	
	25	0,48 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,08 ± 0,01	
Пиразинамид	10	0,53 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,09 ± 0,01	707 ± 41
	20	0,52 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,08 ± 0,01	
	50	0,52 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,08 ± 0,01	

S – стандартное отклонение.

Метрологические характеристики. В последнее время большое внимание уделяется валидации (оценке пригодности) методик анализа. Валидацию аналитической методики проводят, оценивая следующие показатели: селективность, точность, воспроизводимость, степень извлечения, правильность построения градуировочной зависимости, стабильность пробы. Точность и воспроизводимость применяемых методик не должна быть хуже 15% для биоаналитических методов [7].

В табл. 3 приведены метрологические характеристики разработанных нами унифицированных методик. Коэффициенты корреляции градуировочных зависимостей для всех определяемых соединений в выбранном диапазоне концентраций (который был шире интервала терапевтических концентраций) не хуже 0,98. Разница между номинальными и найденными значениями добавок для всех соединений, Δ , характеризующая правильность методики, и среднее квадратическое отклонение, СКО, характеризующее воспроизводимость методики, не превышают допустимого значения 15%, что свидетельствует об отсутствии значимых систематических и случайных погрешностей.

Таблица 3.

Метрологические характеристики унифицированных методик определения лекарственных веществ и их метаболитов.

Определяемое соединение	Предел детектирования, мкг/мл (S/N=3)	Предел количественного определения, мкг/мл (S/N=10)	Верхняя граница линейного диапазона, мкг/мл	Воспроизводимость, СКО, %	Правильность, Δ , %
Гексамидин	1,3	4,3	200	4,2-7,2	4,0-7,0
Дифенин	1,0	3,3	200	4,1-6,6	4,0-4,5
Карбамазепин	0,35	1,2	200	4,3-5,2	6,0-10
Ламиктал	0,15	0,5	100	5,1-6,6	8,3-11
Фенобарбитал	0,75	2,5	200	3,6-3,9	3,0-4,0
Этосуксимид	1	3,3	200	3,8-6,6	7,4-12,5
Метотрексат	0,02	0,07	100	5,3-12,8	5,0-14,2
Изониазид	0,2	0,6	50	3,5-6,2	0,0-2,0
Ацетилизониазид	0,3	1,0	50	1,0-4,4*	1,0-7,0
Пиразинамид	0,06	0,2	100	2,4-3,3	0,0-2,0
Пиразиновая кислота	0,2	0,6	25	1,3-4,6*	2,0-3,0
Рифампицин	0,5	1,5	45	3,0-4,6	0,0-2,0

* - приведены данные по сходимости (СКО, %, в течение дня).

S/N – отношение сигнал/ шум.

Практическое применение. Все разработанные методики были использованы в клинической практике для целей терапевтического лекарственного мониторинга и фармакокинетических исследований.

Унифицированная методика для ПСП прошла апробацию в Иркутской Государственной Областной детской клинической больнице. В период с 1997 по 2006 г.г.

определение концентрации ПСП в сыворотке крови было выполнено для более 900 пациентов, проходящих лечение этими препаратами. Результаты исследований в сочетании с клиническими показателями были использованы врачами для коррекции доз и выбора временных интервалов приема лекарств. По данным исследований около 25% пациентов нуждались в коррекции суточных доз.

Методика определения метотрексата была использована для контроля его концентрации в сыворотке крови для 30 пациентов онкогематологического отделения той же больницы, проходящих лечение высокими дозами МТХ. На рис. 5 приведена зависимость концентрации МТХ от времени в образцах крови пациента, проходящего лечение МТХ по стандартной схеме (1000 мг/м^2 поверхности тела) [6]. На основании полученных данных при проведении последующих инфузий доза МТХ была снижена до 900 мг/м^2 . По результатам проведения исследования отмечено, что 75% пациентов нуждаются в коррекции стандартной схемы лечения.

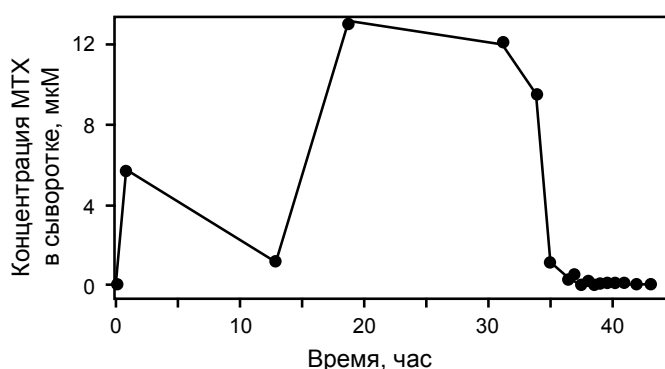


Рис. 5. Изменение концентрации МТХ в сыворотке крови пациента в процессе лечения высокими дозами МТХ.

Унифицированная методика для противотуберкулезных препаратов INH, PZA, RIF в период 2003 – 2006 г.г. прошла апробацию в Новосибирском научно-исследовательском институте туберкулеза, за это время было выполнено более 2,5 тыс. определений. Результаты анализа INH, PZA и их метаболитов использовались в Институте молекулярной биологии и биофизики СО РАМН (г. Новосибирск) при расчете фармакокинетических параметров для научно - исследовательских целей.

На рис. 6 показаны типичные фармакокинетические кривые INH и AcINH для медленных и быстрых ацетиляторов.

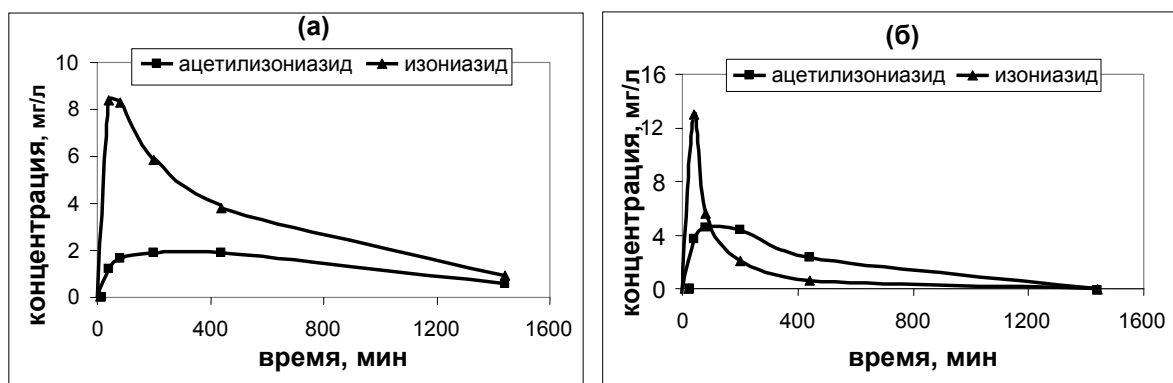


Рис. 6. Фармакокинетические кривые изониазида и ацетилизониазида для (а) - медленных и (б) - быстрых ацетиляторов.

ВЫВОДЫ

Подводя итог, перечислим основные преимущества работы по унифицированным методикам на микроколоночном хроматографе (например, на "Милихроме А-02") с применением многоволнового детектирования и градиентного элюирования :

- возможность определения больших групп ЛВ по унифицированной методике с использованием одного бинарного элюента и колонки с одним и тем же сорбентом;
- высокая селективность разделения при использовании градиентного режима элюирования;
- надежная идентификация веществ с использованием многоволнового детектирования и спектральных отношений;
- значительная экономия дорогостоящих расходных материалов;
- простота подготовки пробы;
- экспрессность анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baram G.I. Portable liquid chromatograph for mobile laboratories. I. Aims // J. Chromatogr. A. -1996.- Vol. 728.- P. 387–399.
2. Федорова Г.А. Оптимизация метода ВЭЖХ для терапевтического лекарственного мониторинга противосудорожных препаратов, метотрексата и циклоспорина А: Автореф. дисс. на соискание уч. степени к.х.н. - Иркутск, 2003.- 24 с.
3. Kozhanova L.A. Determination of anti-tuberculosis drugs in human serum by HPLC: Proceedings of 8th Analytical Russian – German – Ukrainian Symposium (ARGUS): Telecom Tagungshotel Hamburg Bergedorf, 31st August – 5th September 2003.- P. 79-83.
4. Wahlung K.-G. Separation of acidic drugs in the µg/ml range in untreated blood plasma by direct injection on liquid chromatographic columns // J. Chromatogr.- 1981.- Vol. 218.- P. 671-679.
5. Fedorova G.A., Baram G.I., Grachev M.A., et al. Application of Micro – Column HPLC to the Determination of Phenobarbital and Carbamazepine in Human Blood Serum //Chromatographia.- 2001.- Vol. 53, № 9/10.- P. 495-497.
6. Федорова Г.А., Грачев М.А., Подольская Е.П., et al. Контроль концентрации метотрексата методом ВЭЖХ на коротких колонках при химиотерапевтическом лечении // Научное приборостроение.-2006.-Т. 16, №3.- С. 103-106.
7. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation.- Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services: Rockville, Maryland, May 2001.