

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В МЕДИЦИНЕ. ЧАСТЬ 2

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;

Азарова И.Н., к.х.н., ведущий специалист, ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск, Россия, azarova@econova.nsk.ru.

Аннотация. Показаны преимущества использования микроколоночной жидкостной хроматографии для решения задач диагностики заболеваний, контроля качества биодобавок и анализа лекарственных средств с помощью базы данных.

Ключевые слова: ВЭЖХ, микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография, контроль качества лекарственных средств и биодобавок, анализ метаболитов в биологических жидкостях, база данных ВЭЖХ – УФ.

ВВЕДЕНИЕ

В первой части статьи по применению микроколоночной жидкостной хроматографии в медицине были показаны пути решения сложных медицинских задач из области терапевтического лекарственного мониторинга и фармакокинетических исследований. На конкретных примерах было показано, что переход к микроколоночке размером $\varnothing 2 \times 75$ мм позволяет не только значительно снизить стоимость расходных материалов (дорогостоящих сорбентов для колонок и элюентов), но и получить дополнительные преимущества [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.

Во второй части статьи рассматривается использование микроколоночной жидкостной хроматографии для целей диагностики заболеваний, для контроля качества пищевых биодобавок, а также для анализа лекарственных средств с применением базы данных.

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), трифторуксусную кислоту (Sigma, США), перхлорат лития, 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%.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Диагностика заболеваний. Помимо лекарственных веществ (примеры применений были показаны в первой части статьи) с помощью микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в биологических жидкостях можно определять также и различные эндогенные компоненты, увеличение или уменьшение которых по сравнению с нормой может свидетельствовать о наличии наследственных заболеваний или других отклонений в здоровье.

Примером использования микроколоночной хроматографии для диагностики нарушений обмена веществ служит применение для этих целей разработанного нами метода определения сахаров в моче с помощью ВЭЖХ [2]. При гликозуриях различной природы происходит нарушение обмена определенных сахаров, накопление их в крови и выделение с мочой, где они и обнаруживаются с помощью химических методов. Аномальные образцы мочи содержат, как правило, не более трех сахаров, редко пять – шесть.

Сахара относятся к классу соединений, слабо поглощающих свет в УФ-области спектра. Однако такие вещества можно детектировать в виде УФ - поглощающих производных (дериватов), получаемых в результате специальных химических реакций. Определение в виде производного позволяет повысить чувствительность определения в 3 - 4 раза. Кроме того, в некоторых случаях удается существенно сдвинуть максимум поглощения в длинноволновую область УФ спектра, где значительно меньше влияние матрицы и других мешающих компонентов пробы. Для дериватизации восстанавливающих сахаров часто используется такой реагент, как 2,4-динитрофенилгидразин.

Нами предложен метод количественного определения сахаров в моче, основанный на переводе сахаров в 2,4-динитрофенилгидразоны, разделении их на микроколоночном жидкостном хроматографе "Милихром А-02", с регистрацией поглощения на $\lambda = 360$ нм. Условия элюирования: колонка – Nucleosil 100-5 C18, $\varnothing 2 \times 75$ мм. Элюенты: А – 0,1% трифторуксусная кислота в воде; Б – 70% АСН. Градиент: 2200 мкл 16 – 27% Б, 200 мкл 27-100% Б, линейный, 600 мкл 100% Б. Скорость – 150 мкл/мин, температура - 35°C. Объем пробы – 5 мкл.

Определяемые сахара и интервалы концентраций: лактоза - 0,1-2 мг/мл, галактоза - 0,025-0,5 мг/мл, глюкоза - 0,05-1 мг/мл, фруктоза - 0,125 -1,5 мг/мл, арабиноза - 0,0125-0,15 мг/мл, ксилоза - 0,025-0,15 мг/мл. Относительные стандартные отклонения для середины приведенных интервалов: 0,02 - 0,05.

Важным преимуществом данного метода является отсутствие сложной подготовки пробы, связанной с удалением из мочи мешающих веществ. Реализованный в методе многоволновой режим детектирования (длины волн 250, 340, 360 нм - базовая длина волны) позволяет с помощью спектральных отношений - отношений площадей пиков на разных длинах волн к площади пика на базовой длине волны - надежно отличать сахара от других компонентов мочи и продуктов реакции дериватизации. На рис. 1 показаны примеры хроматографического разделения гидразонов сахаров для стандартов сахаров и типичного образца мочи.

Предлагаемый метод был использован для диагностики наследственных заболеваний и патологических состояний в Государственном Новосибирском областном диагностическом центре. В 1999 г. с помощью данного метода было обследовано 80 пациентов, направленных медико – генетическим отделом областного диагностического центра. Выявлено 56 больных с повышенным содержанием различных сахаров: лактозы, галактозы, фруктозы, глюкозы, ксилозы, арабинозы.

Контроль качества пищевых добавок. Стандарты правильного питания в настоящее время немыслимы без использования в пищу различного рода пищевых добавок, БАДов, содержащих в своем составе витамины, антиоксиданты, другие полезные для организма биологически активные соединения. Многие из этих соединений могут быть либо крайне неустойчивыми, либо плохо совмещаться друг с другом в одной композиции. Поэтому очень

важной представляется задача контроля соответствия заявленного состава БАДов реальному, содержания в них отдельных активных компонентов.

Важнейшими компонентами как БАДов, так и концентрированных поливитаминных препаратов (капсулированных или таблетированных фармакопейных препаратов, а также премиксов) являются водо- и жирорастворимые витамины – органические вещества сложной структуры, относящиеся к различным химическим классам, активирующие и поддерживающие основные биохимические реакции в организме. Известно, что многие витамины химически весьма неустойчивы. Это определяет важность задачи контроля витаминного состава различных форм витаминных препаратов в процессе производства, транспортировки, хранения.

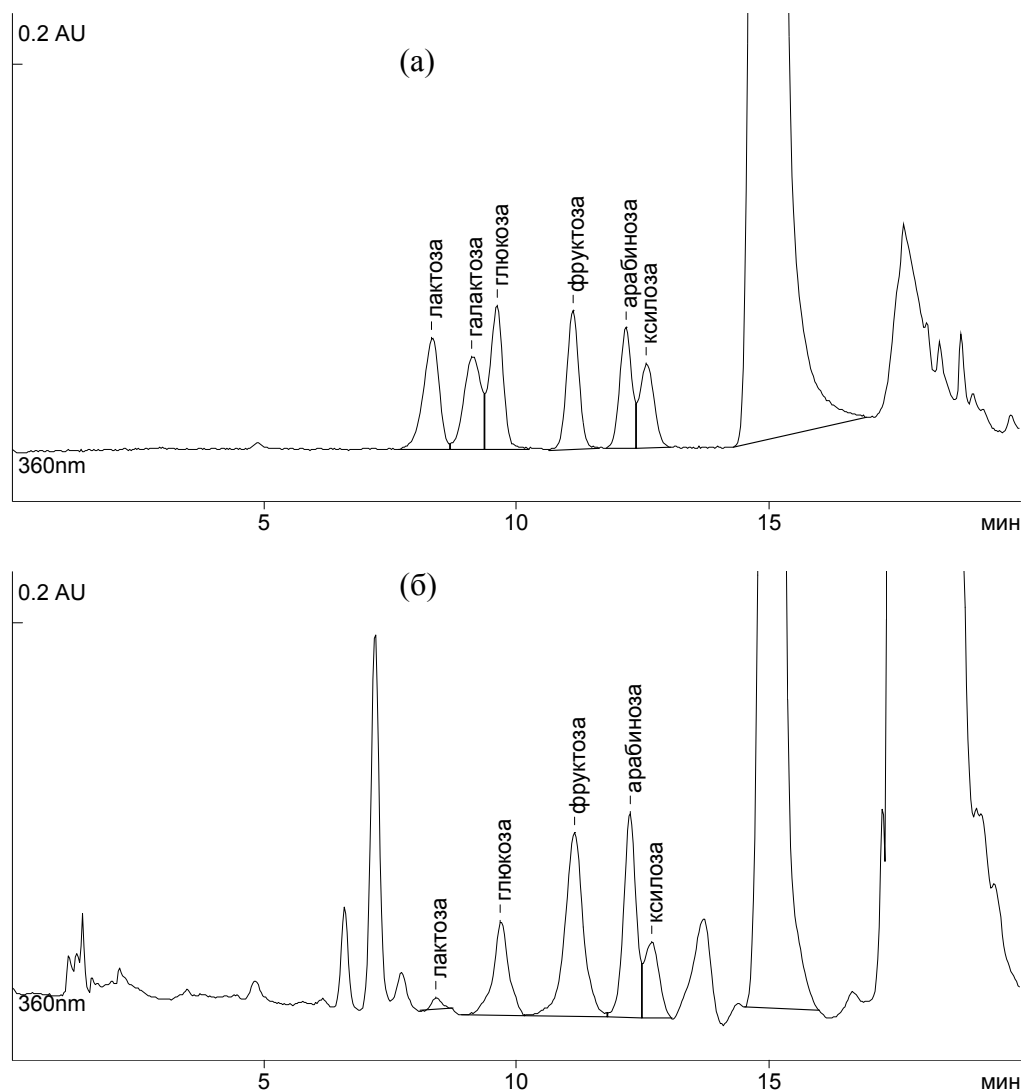


Рис 1. Хроматограммы гидразонов сахаров: (а) - для стандартов сахаров; (б) - для типичного образца мочи.

Метод ВЭЖХ широко применяется для определения одного или нескольких витаминов в подобных объектах, однако, задача оптимизации подготовки пробы к анализу и хроматографического разделения больших групп витаминов остается актуальной.

В работе [3] предложен оптимизированный вариант метода ВЭЖХ, позволяющий без сложной подготовки пробы определять витамины *B1*, *B2*, никотиновую кислоту, никотинамид, пантотеновую кислоту, фолиевую кислоту, витамины *B6*, *B12*, *K3*, *H*, *D2*, *D3* и ацетаты витаминов *A* и *E* в поливитаминных препаратах. Эта методика может быть использована для определения витаминов в любых фармакопейных препаратах - таблетках,

капсулах, растворах. Относительные стандартные отклонения для большинства витаминов: 0,03 - 0,10.

Концентрированные поливитаминные препараты представляют собой сложные смеси витаминов, а также других органических и неорганических веществ - наполнителей различной природы. Иногда эти вещества и некоторые витамины не могут сосуществовать в растворе. Кроме того, для перевода в раствор каждого из витаминов необходимы свои, часто несовместимые с другими условия. Поэтому для улучшения результатов анализа необходимо для каждой смеси уточнять процедуру подготовки пробы (время, pH, температуру растворения и т.д.), учитывая конкретный состав пробы и определяемые в ней витамины. В работе [3] для водо- и жирорастворимых витаминов нами предложены свои универсальные варианты перевода витаминов в раствор с учетом усредненных литературных данных и собственных экспериментов. Что касается жирорастворимых витаминов, то нами было экспериментально показано, что для определения ацетатов витаминов *A* и *E* нет никакой необходимости проводить трудоемкую процедуру щелочного гидролиза.

Используя преимущества жидкостного хроматографа "Милихром А-02" - возможность одновременного многоволнового детектирования и гибкого подбора градиентного режима элюирования - нам удалось подобрать универсальные хроматографические условия для определения практически всех важнейших водо- и жирорастворимых витаминов за две хроматографические процедуры. При этом использование спектральных отношений для идентификации витаминов в дополнение к идентификации по временам удерживания позволяет отказаться от применения стандартов в каждой серии определений.

Условия хроматографического определения витаминов были следующие. Колонка Ø2x75 мм с Nucleosil 100-5 C18. Использовали градиентный режим элюирования для водо-растворимых витаминов. Элюенты: А-0,4 М LiClO₄ (pH 2,4); Б – ACN. Градиент: 8 мин 2% Б, 17 мин от 5 до 18% Б, линейный. Скорость потока – 100 мкл/мин; температура - 35⁰С; объем пробы - 4-10 мкл. Детектирование на 6 длинах волн: 210, 220, 250, 260, 280, 300 нм. Базовые длины волн для построения градуировочных зависимостей витаминов были следующие: для *B6*, *H*, *ПК*, *HA* – 210 нм; *HK* – 250 нм; *B1* – 260 нм; *B2*, *Bc*, *K3* – 280 нм. Для жирорастворимых витаминов использовали изократический режим элюирования. Элюент: ацетонитрил : вода (95 : 5). Скорость потока – 100 мкл/ мин.; температура - 35⁰С; объем пробы - 2-10 мкл. Детектирование на 6 длинах волн: 260, 270, 280, 290, 300, 320 нм. Базовые волн для построения градуировочных зависимостей витаминов следующие: *A*- ацетат, *E*-ацетат – 290 нм; *D2*, *D3* – 260 нм. Выбор базовых длин волн для некоторых витаминов, в частности для *A*- ацетата, не совпадает с их максимумами поглощения, но обеспечивает единый диапазон измерений для всех витаминов.

На рис. 2 приведены хроматограммы фармакопейного поливитаминного препарата для мужчин "One a day" (Bayet, США) для водо- и жирорастворимых витаминов на трех длинах волн, выполненные по описанной методике.

Контроль качества лекарственных средств. Важнейшими показателями качества лекарственного средства (ЛС) являются содержание в нем основного вещества (веществ), а также присутствие вредных примесей не выше уровня, установленного требованиями нормативных документов. Основным методом, применяемым во всем мире для проверки этих показателей, является ВЭЖХ. В России развитие системы контроля качества ЛС как на предприятиях - изготовителях, так и на государственном уровне идет в направлении "гармонизации" с соответствующими системами ведущих стран. Однако прямое заимствование зарубежного опыта в решении задач контроля качества ЛС имеет ряд недостатков: фармацевтические статьи ориентированы на использование дорогостоящего оборудования, построены по принципу "для каждого вещества - своя методика анализа", перед каждым анализом необходима калибровка хроматографа по всем определяемым веществам.

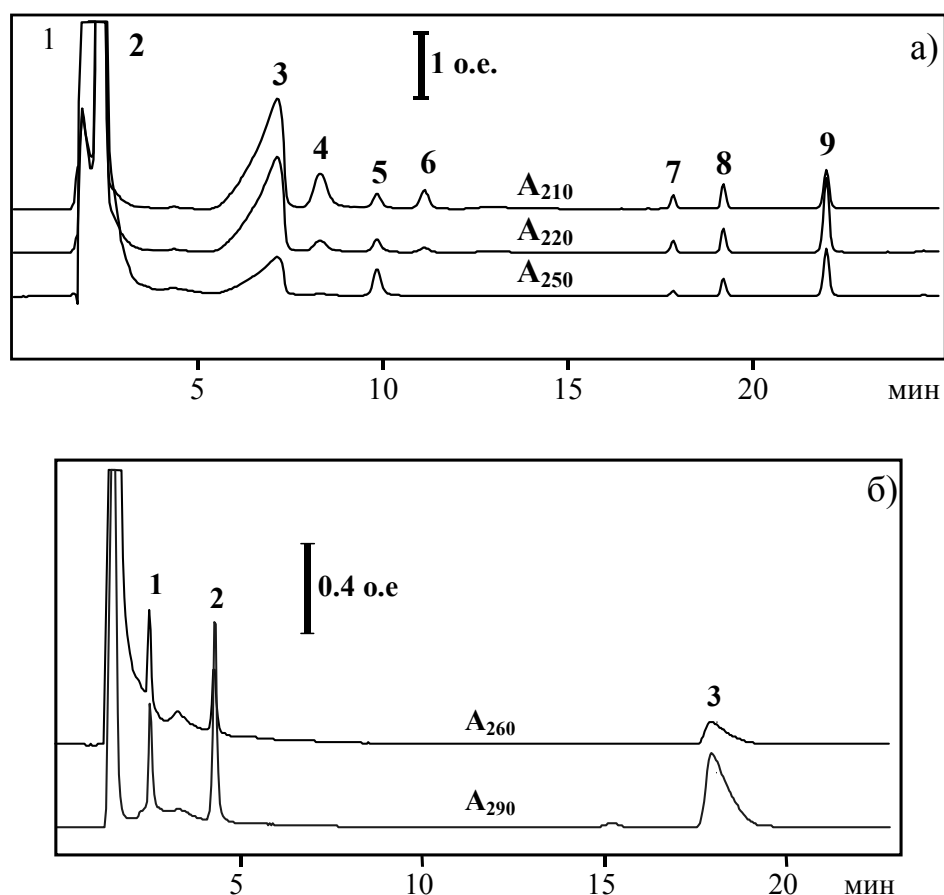


Рис. 2. Хроматограммы препарата "One a day": (а) – для водорастворимых витаминов, пики витаминов: 3- *НА*, 4- *В6*, 5- *В1*, 6- *ПК*, 7- *Вс*, 9- *В2*; (б) – для жирорастворимых витаминов, пики витаминов: 2- *А*-ацетат, 3- *Е*-ацетат.

В качестве альтернативы принципу "каждому веществу - своя методика анализа" авторы работы [4] предложили унифицированную методику анализа ЛС, реализуемую с помощью ВЭЖХ – анализатора. Такой ВЭЖХ – анализатор был разработан на основе микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром А-02".

ВЭЖХ - анализатор осуществляет автоматический анализ в градиентном режиме на колонке с обращенной фазой с одновременным детектированием на 8 длинах волн в диапазоне 210 - 300 нм. Анализатор снабжен компьютерной базой данных (БД), содержащей хроматографические и спектральные параметры веществ - аналитов. Идентификация хроматографических пиков проводится автоматически с помощью специализированной программы обработки МультиХром-СПЕКТР (ЗАО "Амперсенд", Москва) путем сравнения их объемов удерживания и спектральных отношений с параметрами, содержащимися в базе данных. Наличие БД позволяет идентифицировать компоненты анализируемого образца и определять их концентрацию в образце без обязательной предварительной калибровки хроматографа по определяемым веществам. В настоящее время БД включает порядка 500 веществ, и их количество постоянно увеличивается.

Стандартные условия хроматографического определения ЛС с помощью БД следующие. Колонка: Ø2x75 мм с обращенно-фазовым сорбентом С18. Элюенты: А - 0.2М LiClO₄ и 0.005М HClO₄ в воде; Б – ACN. Градиент: от 5% Б до 100% Б за 40 мин, линейный, 100% Б 3 мин. Скорость потока - 100 мкл/мин. Температура - 40°C. Детектирование: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм. Объем образца - 4 мкл [5]. Используемые элюенты стабильны во времени и не требуют ежедневного приготовления. Хроматографическая колонка в данных условиях эксплуатации выдерживает не менее 1000

анализов. Формирование БД осуществляется на калиброванном "эталонном" хроматографе "Милихром А-02" с применением стандартных образцов веществ согласно методике [6].

Для проверки пригодности ВЭЖХ – анализатора к работе с БД разработана процедура валидации, заключающаяся в хроматографировании в тех же "стандартных" условиях 5-ти компонентной тестовой смеси, где каждый компонент является "индикатором" определенных параметров хроматографической системы [5].

Предлагаемая методика идентификации и количественного определения ЛС по базе данных надежно работает не только с однокомпонентными образцами, но и с многокомпонентными ЛС. Пример хроматограммы одного из них – раствора таблетированного препарата "Седал М" (Фармацевтические заводы Милве, Болгария) - показан на рис. 3.

Таким образом, анализ ЛС с использованием БД является весьма привлекательной альтернативой сложившейся традиции в ВЭЖХ анализе ЛС и может стать основой создания единой общегосударственной системы контроля качества ЛС [7].

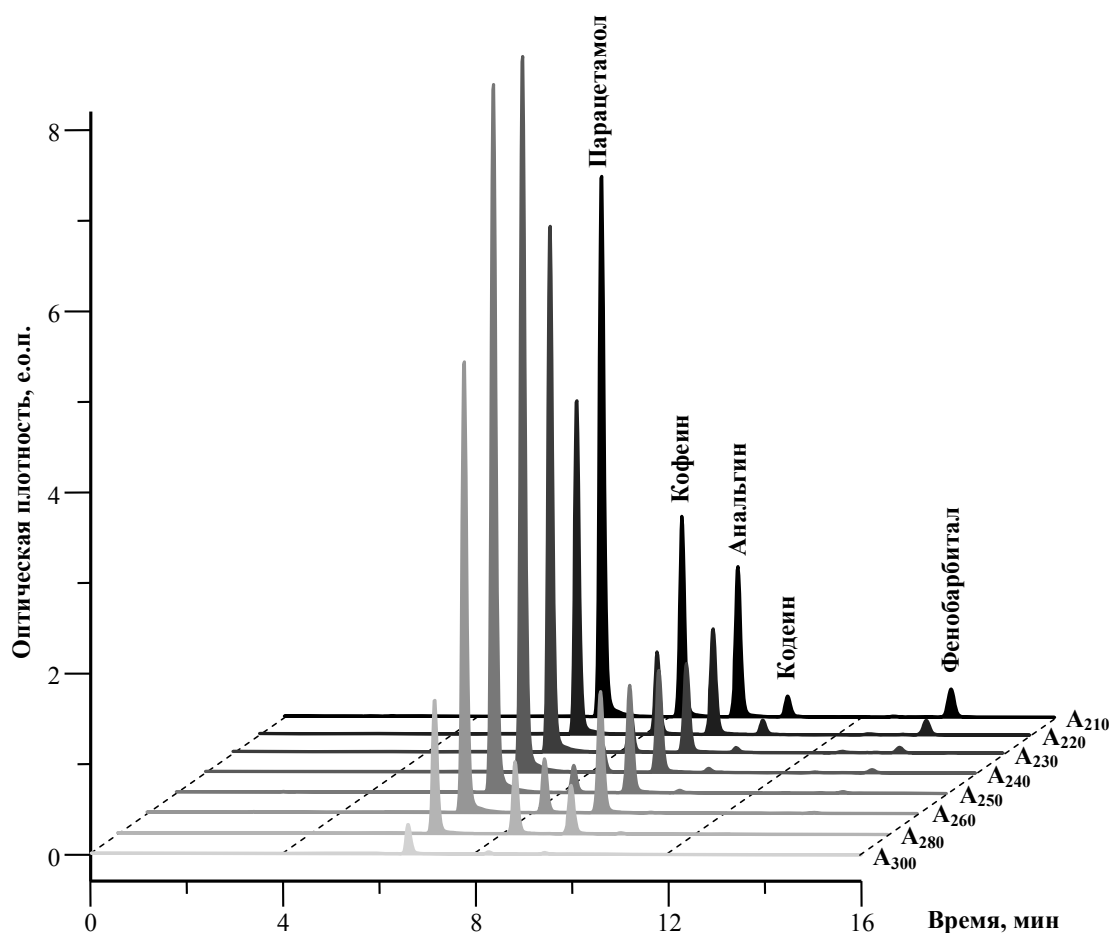


Рис. 3 . Хроматограмма водного раствора порошка таблеток "Седал М".
Концентрации (мг/мл): парацетамол - 0,35; кофеин - 0,06; анальгин - 0,18; кодеин - 0,014; фенобарбитал - 0,02.

ВЫВОДЫ

Подводя итог, перечислим основные преимущества применения микроколоночного хроматографа с возможностями многоволнового детектирования и градиентного элюирования для решения медицинских задач:

- высокая селективность разделения с использованием градиентного режима элюирования;

- надежная идентификация веществ с применением многоволнового детектирования;
- возможность идентификации и количественного определения ЛВ по базе данных без использования стандартных образцов;
- значительная экономия дорогостоящих расходных материалов;
- 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. Куприянова Л.Я., Кожанова Л.А. Метод количественного определения сахаров в моче с помощью ВЭЖХ // Современные медицинские технологии: Сборник научных трудов.- Новосибирск.- 1999.- С. 292-295.
3. Кожанова Л.А., Федорова Г.А., Барам Г.И. Определение водо- и жирорастворимых витаминов в поливитаминных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журнал аналитической химии.- 2002.-Т. 57, №1.- С. 49-54.
4. Барам Г.И., Рейхарт Д.В., Гольдберг Е.Д., Изотов Б.Н., Родинко М.О., Хазанов В.А. Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармакопейном анализе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2003.- Т. 135, №1.- С. 75-79.
5. Массовая концентрация УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. №ФР.1.31.2003.00950.
6. Хроматографические и спектральные параметры УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. №ФР.1.31.2003.00951.
7. Барам Г.И., Гольдберг Е.Д., Рейхарт Д.В., Хабриев Р.У., Хазанов В.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в контроле качества лекарственных средств // Фарматека.- 2005.- №2.- С. 12-15.