

Опыт разработки биоаналитических методик методом ВЭЖХ с УФ-детектированием

В.М. Косман, М.В. Карлина, М.Н. Макарова

ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»,

188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмолово, Заводская ул., д. 3/245

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Косман Вера Михайловна – руководитель группы химико-аналитических исследований старший научный сотрудник, ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (812) 603-74-28, +7 (921) 740-49-24. E-mail: kosman.vm@doclinika.ru, info@doclinika.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>

Карлина Марина Валерьевна – руководитель группы фармакокинетики, старший научный сотрудник, ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (812) 603-74-28, +7 (921) 394-33-10. E-mail: karlina.mv@doclinika.ru, info@doclinika.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>

Макарова Марина Николаевна – заместитель генерального директора, ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», доктор медицинских наук. Тел.: +7 (812) 603-74-28, +7 (911) 270-27-51. E-mail: makarova.mn@doclinika.ru, info@doclinika.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

РЕЗЮМЕ

Введение. Одним из наиболее часто применяемых в настоящее время методов для количественного анализа лекарственных веществ в биопробах, полученных при изучении фармакокинетики, биоэквивалентности или лекарственного мониторинга, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием. Он отличается гибкостью, позволяющей создавать множество методик с различными вариантами условий хроматографического разделения, детектирования, процедуры подготовки проб и др., ориентированных на конкретные целевые аналиты, учитывающие их свойства и особенности. Вместе с тем по мере накопления опыта и обобщения данных формируются те или иные закономерности, выявляющиеся наиболее часто встречающиеся, удобные вариации, приемы или их сочетания.

Материал и методы. Представлен обзор экспериментального опыта по разработке биоаналитических методик с применением метода ВЭЖХ с УФ-детектированием для количественного анализа лекарственных веществ природного и синтетического происхождения в биопробах, полученных при изучении фармакокинетики и биоэквивалентности. Представленные материалы объединяют как методики, разработанные для фармакокинетических исследований, проводимых с использованием лабораторных животных (крыс, кроликов), так и для исследований по биоэквивалентности, выполняемых с участием здоровых добровольцев.

Результаты и обсуждение. Отмечено, что практически во всех случаях анализ выполнен в варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ на аналитических колонках типа C18. В большинстве случаев (68%) подобраны изократические режимы элюирования со временем удерживания целевого аналита в диапазоне 4–8 мин; в 63% случаев в качестве элюента выбраны смеси водного раствора трифторуксусной кислоты и ацетонитрила в различных соотношениях.

Выделено три области УФ-спектра, наиболее часто используемые для детектирования – 205–220 нм (25% случаев), 220–254 нм (31%) и 270–295 нм (35%), в 9% случаев используются другие длины волн, что характеризует общие особенности спектров поглощения органических соединений.

Для подготовки биопроб плазмы крови перед дозированием в ВЭЖХ систему использованы экстракционная (36% случаев) и осадительная пробоподготовки (64% случаев). Наиболее употребительным оказалось осаждение белков плазмы ацетонитрилом (64%); метанол (15,5%) и кислотные или иные осадители (20,5%) оказались оптимальны примерно в одинаковом числе случаев.

По результатам валидационных испытаний установлено, что для большинства методик нижний предел количественного определения находится в диапазоне около 0,01–0,1 мкг/мл, что согласуется с литературными данными (0,05–0,1 мкг/мл).

Ключевые слова: биопробы, хроматографический режим, длина волны детектирования, пробоподготовка, осадительный реагент

Для цитирования: Косман В.М., Карлина М.В., Макарова М.Н. Опыт разработки биоаналитических методик методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Фармация, 2020; 69 (3): 23–35. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-04>

EXPERIENCE IN DEVELOPMENT OF BIOANALYTICAL METHODS BY HPLC WITH UV DETECTION

V.M. Kosman, M.V. Karlina, M.N. Makarova

St.-Petersburg Institute of Pharmacy, 188663, Russian Federation, Leningrad region, Vsevolozhski municipal district, Kuzmolovo, Zavodskaya str., build. 3/245, tel/fax (812) 6037428, e-mail: info@doclinika.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Kosman Vera M., head of chemical-analytical research group, senior researcher, St.-Petersburg Institute of Pharmacy, PhD in Pharmacy. Tel.: 812-603-74-28, +7-921-740-49-24. E-mail: kosman.vm@doclinika.ru, info@doclinika.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>

Karlina Marina V., head of pharmacokinetics group, senior researcher, St.-Petersburg Institute of Pharmacy, PhD in Pharmacy. Tel.: 812-603-74-28, +7-921-394-33-10. E-mail: karlina.mv@doclinika.ru, info@doclinika.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>

Makarova Marina N. – depute of general director, St.-Petersburg Institute of Pharmacy, Doctor of Medicine. Tel.: 812-603-74-28, +7-911-270-27-51. E-mail: makarova.mn@doclinika.ru, info@doclinika.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

SUMMARY

Introduction. The HPLC method with UV-detection is one of most often used modern method for the quantitative analysis of drugs in biosamples obtained during pharmacokinetics, bioequivalence or drug monitoring studies. This method may be characterized by flexibility, allowing to create many assays with different variants of chromatographic separation conditions, detection, sample handling procedures, etc., oriented to specific target analytes, taking into account their properties and peculiarities. However, as experience is gained and data are compiled, patterns are formed, and the most common, convenient variations, techniques, or combinations may be identified.

Material and methods. An overview of experimental experience in the development of bioanalytical methods using HPLC-UV method for quantitative analysis of natural and synthetic drugs in biosamples obtained after pharmacokinetics and bioequivalence studies is presented.

Results and discussion. Analysis was performed in reverse phase HPLC on analytical C18 type columns in almost cases. Isocratic elution regimes were selected in most cases (68%), retention times of the target analytes were the range of 4–8 minutes. In 63% of cases mixtures of aqueous solution of trifluoroacetic acid and acetonitrile in different ratios were selected as eluent. Methods developed for pharmacokinetic studies with laboratory animals (rats, rabbits) and for bioequivalence studies done with the participation of healthy volunteers are combined in the presented materials.

Three regions of the UV spectrum were selected as most commonly used for detection – 205–220 nm (25%), 220–254 nm (31%), 270–295 nm (35%), and 9% of other wavelengths. These results characterizes general features of absorption spectra of organic compounds.

Extraction (in 36% of cases) and precipitation (in 64% of cases) were used for sample handling prior to dosing in HPLC. Precipitation of plasma proteins with acetonitrile (64%) proved to be most common; methanol (15.5%) and acidic or other precipitating agents (20.5%) were optimal in about the same number of cases.

The lower quantification limit founded from validation tests for most techniques was in the range of about 0.01–0.1 µg/ml, consistent with literature (0.05–0.1 µg/ml).

Key words: biosamples, chromatographic regime, detection wavelength, sample handling, precipitation agent

For reference: Kosman V.M., Karlina M.V., Makarova M.N. Experience in developing bioanalytical methods by HPLC with UV detection. *Farmatsiya*, 2020; 69 (3): 23–35. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-04>

Введение

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием является удобным, эффективным и достаточно экспрессным методом количественного анализа лекарственных веществ в биопробах, полученных при изучении фармакокинетики, биоэквивалентности или лекарственного мониторинга [1–4]. По данным диссертационного исследования Д.В. Ярошенко («Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии». Дисс. ... канд. хим. наук. СПб: 2014) в последние 10 лет метод ВЭЖХ используют в 48%, а ВЭЖХ-УФ – в 21% исследований, посвященных определению лекарственных веществ в плазме крови.

Метод ВЭЖХ-УФ является гибким и многообразным, позволяя создать множество методик с различными вариантами условий хроматографического разделения, детектирования, процедуры подготовки проб и т.п., ориентированных на

конкретные целевые аналиты, учитывающие их свойства и особенности. Вместе с тем по мере накопления опыта формируются те или иные закономерности, выявляются наиболее часто встречающиеся, удобные вариации, приемы или их сочетания, которые становятся общепринятой нормой, вытесняя остальные. Примером подобного процесса может являться доминирующее положение обращенно-фазного варианта ВЭЖХ на колонках с привитыми октадецильными (C18) фазами, на которых по данным [5] выполняется не менее 90% всех разделений низкомолекулярных соединений.

Данная работа посвящена систематизации и ретроспективному анализу собственного многолетнего экспериментального опыта по разработке биоаналитических методик с применением метода ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Материалы, освещенные в данной публикации, получены в ходе доклинических и клинических исследований, включавших этапы по разработке и валидации биоаналитических методик

для нескольких десятков различных лекарственных веществ природного и синтетического происхождения (>60 веществ). Результаты некоторых исследований были опубликованы нами ранее [9–15]. Представленные материалы объединяют как методики, разработанные для фармакокинетических исследований, проводимых с использованием лабораторных животных (крыс, кроликов), так и для исследований по биоэквивалентности, выполняемых с участием здоровых добровольцев. Такое объединение, на наш взгляд оправдано, поскольку с аналитической точки зрения эти два типа исследований чрезвычайно близки. Отличия заключаются в биопринадлежности плазмы крови – плазма крови крыс, кроликов для фармакокинетических исследований и плазма крови человека для исследований по биоэквивалентности, и, возможно, уровнях концентраций аналита, связанных с уровнями доз и общим объемом крови. У человека уровни концентраций, которые необходимо определять, обычно ниже, т.е. методика должна быть более чувствительной.

Материал и методы

В работе использована гепаринизированная плазма крови интактных животных (крыс и кроликов) и добровольцев, хранившаяся в замороженном виде при -20°C . Субстанции соответствующих лекарственных веществ или индивидуальные соединения природного происхождения использованы в качестве стандартных образцов для разработки и валидации методик их количественного определения в биопробах.

Анализ выполнен на хроматографах высокого давления фирмы Shimadzu (Япония) с диодно-матричными детекторами и колонками Luna C18 (2) $4,6 \times 150$ мм (размер частиц сорбента 5 мкм), снабженными предколонками (3 мм) заполненными тем же сорбентом (Phenomenex, США). Элюирование проводили подвижными фазами, содержащими ацетонитрил, метанол, 0,03% раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ) и другие компоненты в различных градиентных и изократических режимах элюирования, скорость подачи элюента 0,8–1,3 мл/мин, дозируемый объем проб 20–100 мкл, детектирование – диодно-матричное сканирование в диапазоне длин волн от 200–220 до 340–400 нм, обработка хроматограмм при длинах волн специфичных для каждого конкретного аналита.

Регистрация и обработка хроматограмм выполнена с помощью программного обеспечения LabSolution (Shimadzu, Япония).

Результаты и обсуждение

Биоаналитическая методика с применением метода ВЭЖХ-УФ, как любая аналитическая методика, включает два основных фрагмента – описание процедуры подготовки проб и описание условий выполнения измерений, включающее условия хроматографического анализа. Разработка методики начинается с подбора оптимальных условий хроматографического анализа на примере раствора стандартного образца (СО) определяемого соединения в подходящем сравнительно простом растворителе (вода, метанол, и др.). В нашей практике в большинстве случаев в качестве СО использованы субстанции соответствующих лекарственных веществ с известным содержанием основного компонента.

Практически для всех объектов использован один тип хроматографических колонок – Luna C18 (2) $4,6 \times 150$ мм (размер частиц сорбента 5 мкм); только для цитохрома С более подходящей оказалась колонка Jupiter Proteo с аналогичными размерами – $4,6 \times 150$ мм (размер частиц сорбента 4 мкм). Это подтверждает устоявшееся суждение о том, что фаза C18 имеет наиболее широкое применение в практике ВЭЖХ. Для колонок с внутренним диаметром 4,6 мм оптимальным считают скорость подачи элюента 1 мл/мин [5], время хроматографирования для такого типа колонок обычно от нескольких минут до нескольких десятков минут. Поскольку разрабатываемые нами методики предназначались для дальнейшего серийного анализа биопроб, хроматографический режим подбирали так, чтобы время удерживания целевого аналита находилось в интервале от 4–5 до 7–8 мин, общее время записи хроматограммы не превышало 10 мин для изократических и 15–20 мин (с учетом уравновешивания системы в начальном состоянии) для градиентных режимов. В области времен удерживания до 3–4 мин обычно наблюдали значимое влияние гидрофильных несорбируемых поглощающих в УФ-свете компонентов биологической матрицы (плазмы крови), поэтому выбор более быстрых режимов для данного типа колонок нецелесообразен. При оценке приемлемости хроматографического режима обращали внимание на асимметрию пика аналита, которая в большинстве случаев не превышала 2–2,5. Длину волны детектирования стремились выбирать в максимуме поглощения целевого аналита в более специфичной области спектра; при наличии нескольких максимумов оценивали их интенсивность и выбирали оптимум между более ин-

тенсивной, но более ближневолновой областью, или менее интенсивной, но более специфичной и дальневолновой областью. Второй случай предпочтительнее, так как меньше влияние эндогенных компонентов матрицы, поглощающих в ближней УФ-области спектра. Однако следует принимать во внимание, что снижается также и чувствительность методики из-за снижения интенсивности поглощения целевого анализата. При отсутствии специфических максимумов выбирали длину волны детектирования в ближневолно-

вой области спектра. Использование элюентов на основе ацетонитрила, с минимальным содержанием солей в водной составляющей в таком случае предпочтительнее, так как позволяет работать в области <220 нм.

В табл. 1 представлен обзор хроматографических условий, признанных по результатам экспериментальной работы оптимальными для исследованных веществ. Анализаты приведены в алфавитном порядке по международным непатентованным названиям (МНН), где это применимо.

Таблица 1

Обзор ВЭЖХ-условий для анализа ряда лекарственных препаратов в биопробах

Table 1

Review of HPLC conditions for the analysis of a number of drugs in biosamples

№ п/п	Аналит, химическое название	Режим	Элюент, соотношение (об/об)	Длина волны, нм
1.	Абакавир, (1S,4R)-4-[2-амино-6-(циклопропиламино)-9Н-пурин-9-ил]-2-циклопентен-1-метанол	Изократический	0,03% раствор ТФУ : ацетонитрил, 88:12	295
2.	Амлодипин, 2-[(2-Аминоэтокси)метил]-4-(2-хлорфенил)-1,4-дигидро-6-метил-3,5-пиридин дикарбоновой кислоты 3-этил 5-метилловый эфир	Градиентный	0,2% раствор триэтиламина, доведенный до рН 2,5 50% раствором фосфорной кислоты, : ацетонитрил	235
3.	Аторвастатин, [R(R*R*)]-2-(4-фторфенил)-β, δ-дигидрокси-(1-метилэтил)-3-фенил-4-[(фениламино)карбонил]-пиррол-1-гептановая кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ : ацетонитрил, 30:70	245
4.	Ацикловир, 2-амино-9-((2-гидроксиэтокси)метил)-1Н-пурин-6(9Н)-он	Изократический	Буферный раствор, содержащий 1,5% уксусной кислоты и 0,5% триэтиламин, : метанол, 98:2	250
5.	Бетулин, пентациклический тритерпеновый спирт ряда лупана	Изократический	Ацетонитрил	202
6.	Бикалутамид, (±)-4'-Циано-α,α,α-трифтор-3-[(п-фторфенил)сульфонил]-2-метил-м-лактололуидид	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 50:50	270
7.	Бисопролол, 1-[4-[[2-(1-Метилэтокси)этокси]метил]феноксид]-3-[(1-метилэтил)амино]-2-пропанол	Изократический	0,5% раствор уксусной кислоты и 0,15% раствор триэтиламина : ацетонитрил, 75:25	225
8.	Бортезомиб, [(1R)-3-Метил-1-[(2S)-1-оксо-3-фенил-2-[[пиразинилкарбонил]амино]пропил]амино]бутил]бороновая кислота	Градиентный	0,1% раствор фосфорной кислоты, доведенный до рН 6,0 триэтиламин, : ацетонитрил	270
9.	Босвелловые кислоты – босвелловая кислота (БК), ацетилбосвелловая кислота (АБК), кетобосвелловая кислота (КБК), ацетилкетобосвелловая кислота (АКБК), компоненты экстракта босвеллии (<i>Boswellia serrata</i> Roxb.)	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	210 и 254
10.	Букридон, букридона гидрохлорид	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	250
11.	Венлафаксин, (1-[2-(Диметиламино)-1-(4-метоксифенил)этил]циклогексанол) и о-десметилвенлафаксин	Градиентный	0,2% раствор ТФУ: ацетонитрил	225
12.	Витамин Е (токоферола ацетат), 6-ацетокси-2-метил-2-(4,8,12-триметилтридецил)-хроман	Изократический	Метанол	284
13.	Гиосцина бутилбромид, [7(S)-(1α,2β,4β,5α,7β)]-9-Бутил-7-(3-гидрокси-1-оксо-2-фенилпропокси)-9-метил-3-окса-9-азония трицикло [3.3.1.0 ^{2,4}]нонана бромид	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	210
14.	Гопантенная кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 90:10	205

Продолжение табл. 1
Continuing of table 1

№ п/п	Аналит, химическое название	Режим	Элюент, соотношение (об/об)	Длина волны, нм
15.	Дарунавир, [(1S,2R) – 3-[[[4-аминофенил]-сульфонил] (2-метилпропил)-амино] – 2 – гидроксид – 1 – пропил-(фенилметил)-карбамоиновая кислота (3R, 3aS, 6aR)-эстер фуран-3-ил гексагидрофурано-[2,3-b]	Изократический	0,1 М раствор муравьиной кислоты: ацетонитрил, 50:50	265
16.	Дигидрокверцетин, 3,3',4',5,7-пентагидроксифлаванон	Градиентный	0,03% раствор ТФУ:ацетонитрил	290
17.	Диклофенак, 2-[[2,6-Дихлорфенил]амино]бензолуксусная кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 35:65	275
18.	Доксазозин, (1-(4-Амино-6,7-диметокси-2-хиназолинил)-4-[[2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-2-ил]карбонил]пиперазин)	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 70:30	246
19.	Доцетаксел, (2R,3S)-N-Карбокси-3-фенилизосерин-N-трет-бутил-13-5β,20-эпокси-1,2α,4,7β,10β,13α-гексагидрокситакс-11-ен-9-он-4-ацетат-2-бензоата тригидрат	Изократический	Вода очищенная: ацетонитрил, 50:50	229
20.	Дутастерид, (5α,17β)-N-(2,5-бис(трифторметил)-фенил)-3-оксо-4-азаадрост-1-ен-17-карбоксамид	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 30:70	240
21.	Зидовудин, 3'-азидо-3'-дезокситимидин	Изократический	Буферный раствор с рН 3,8 (1,9 г/л аммония уксуснокислого, доведенный до рН 3,8 ледяной уксусной кислотой): метанол, 70:30	265
22.	Ибупрофен, α-Метил-4-(2-метилпропил)-бензолуксусная кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 35:65	220
23.	Изотретиноин, 13-цис-ретиноевая кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: метанол, 10:90	356
24.	Икариин, компонент экстракта горянки (<i>Epimedium koreanum</i> L.)	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	270
25.	Иматиниб, [(4-метил-1-пиперазинил)метил]-N-[4-метил-3-[[[4-(3-пиридинил)-2-пиримидинил]амино]-фенил]бензамид метансульфонат	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	265
26.	Иринотекан, (+)-7-Этил-10-гидроксикамфотецин-10-[1,4'-биперидин]-1'-карбоксилат	Изократический	Буферный раствор, содержащий 0,01 моль/л ацетата аммония и 0,1% муравьиной кислоты: ацетонитрил, 75:25	220
27.	Каберголин, 1-[(6-Аллилэрголин-8β-ил)карбонил]-1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилмочевина	Изократический	Фосфатный буферный раствор с рН 2,0 (6,8 г/л калия фосфорнокислого однозамещенного доведенный до рН 2,0 50% раствором кислоты фосфорной, и содержащий 0,2 мл триэтиламина): ацетонитрил, 82:18	215
28.	Катехин, (+)-катехин, компонент экстракта лапчатки белой (<i>Potentilla alba</i> L.)	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	280
29.	Кверцетин, 2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-4Н-1-бензопиран-4-он	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 65:35	370
30.	Кетопрофен, 3-бензоил-α-метилбензолуксусная кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 50:50	254
31.	Клопидогрел, метил-(+)-(S)-α-(o-хлорфенил)-6,7-дигидротиено[3,2-с]пиридин-5(4Н)-ацетат в организме метаболизируется до неактивного метаболита – карбоксиловой кислоты клопидогрела	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	220
32.	Ламивудин, (2R-цис)-4-Амино-1-[2-(гидроксиметил)-1,3-оксатиолан-5-ил]-2(1Н)-пиримидинон	Изократический	Буферный раствор с рН 3,8 (1,9 г/л аммония уксуснокислого, доведенный до рН 3,8 ледяной уксусной кислотой): метанол, 90:10	277
33.	Леветирацетам, (-)-(s)-этокси-2-оксо-1-пирролин ацетамид	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 10:90	205

№ п/п	Аналит, химическое название	Режим	Элюент, соотношение (об/об)	Длина волны, нм
34.	Левифлоксацин, (-)-S)-9-Фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7Н-пиридо[1,2,3-de]1,4-бензоксазин-6-карбоновая кислота гемигидрат	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 82:18	295
35.	Лейпрорелин, 6-D-Лейцин-9-(N-этил-L-пролинамид)-10-деглицинамид-лютеинизирующий гормон-рилизинг-фактор	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	210
36.	Линезолид, N-[[[(5S)-3-[3-Фтор-4-(4-морфолинил)фенил]-2-оксо-5-оксазолидинил]метил]ацетамид	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 75:25	250
37.	Лозартан, 2-Бутил-4-хлор-1-[[2'-(1Н-тетразол-5-ил)[1,1'-бифенил]-4-ил]-метил]-1Н-имидазол-5-метанол	Градиентный	Буферный раствор с рН 2,5 (0,2% раствор триэтиламина, доведенный до рН 2,5 50% раствором фосфорной кислоты): ацетонитрил	220
38.	Лютеин, 3,3'-дигидрокси-β-каротин	Изократический	Метанол : ацетонитрил 5:95	450
39.	Мелатонин, N-[2-(5-Метокси-1Н-индол-3-ил)этил]ацетамид	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 75:25	220
40.	Метокситиозинид, 1-(2-хлор-6-метоксихинолин-3-ил)-4-(диметиламино)-2-(1-нафтил)-1-фенилбутан-2-ол в виде гидрохлорида	Изократический	Буферный раствор, содержащий 0,5% ледяной уксусной кислоты и 0,15% триэтиламина: ацетонитрил, 50:50	225
41.	Миртазапин, 1,2,3,4,10,14b-Гексагидро-2-метилпиразино[2,1-a]пиридо[2,3-c][2]бензазепин	Изократический	0,03% раствор ТФУ и 0,3% триэтиламина: ацетонитрил в соотношении 35:65	295
42.	Моксифлоксацин, 1-циклопропил-6-фтор-1,4-дигидро-8-метокси-7-(4aS,7aS)-октагидро-6Н-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил]-4-оксо-3-хинолинкарбоновая кислота (в виде гидрохлорида)	Изократический	Буферный раствор, содержащий 0,5% ледяной уксусной кислоты и 0,15% триэтиламина: ацетонитрил, 75:25	295
43.	Неларабин, (2-амино-β-D-арабинофуранозил-6-метокси-9Н-пурин) и 9-β-D-арабинофуранозилгуанин	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	280 и 254
44.	Оксалиплатин, [(1R,2R)-1,2-Циклогександиамин-N,N']оксалато(2)-O,O']платина	Изократический	Буферный раствор, содержащий 0,5% ледяной уксусной кислоты и 0,15% триэтиламина: ацетонитрил, 97:3	220
45.	Рабепразол, 2-[[[4-(3-Метоксипропокси)-3-метил-2-пиридил]метил]сульфинил]бензимидазол	Изократический	Буферный раствор с рН 4,0 (1,9 г/л аммония уксуснокислого, доведенный до рН 4,0 ледяной уксусной кислотой): ацетонитрил, 70:30	280
46.	Ребамипид, N-(4-хлорбензоил)-3-(2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)аланин	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 65:35	230
47.	Рибавирин, 1-β-D-рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид	Изократический	Вода очищенная	210
48.	Рисперидон, 3-[2-[4-(6-Фтор-1,2-бензизоксазол-3-ил)пиперидино]этил]-6,7,8,9-тетрагидро-2-метил-4Н-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он	Градиентный	Буферный раствор с рН 6,5 (154 г/л аммония ацетата, доведенный до рН 6,5 ледяной уксусной кислотой): ацетонитрил	275
49.	Рифабутин, (9S,12E,14S,15R,16S,17R,18R,19R,20S,21S,22E,24Z)-6,18,20-тригидрокси-14-метокси-7,9,15,17,19,21,25-гептаметил-1'-(2-метилпропил)-5,10-26-триоксо-3,5,9,10-тетрагидроспиро[9,4-(эпоксипентадека[1,11,13]триенимино)-2Н-фуоро[2',3',7,8]нафто[1,2d]имидазол-2,4'-пиперидин]-16-ил-ацетат	Изократический	Буферный раствор с рН 4,0 (3,8 г/л аммония уксуснокислого, доведенный до рН 4,0 ледяной уксусной кислотой): ацетонитрил, 50:50	275
50.	Силденафил, 1-[[3-(6,7-Дигидро-1-метил-7-оксо-3-пропил-1Н-пиразоло[4,3-a]пиримидин-5-ил)-4-этоксифенил]сульфонил]пиперазина цитрат	Изократический	Буферный раствор с рН 5,5 (0,2% раствор фосфорной кислоты, доведенный до рН 5,5 40% раствором гидроксида натрия): ацетонитрил, 55:45	225
51.	Схизандрин (схизандрол А), компонент экстракта лимонника китайского (<i>Schisandra chinensis</i> L.)	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	250

Продолжение табл. 1
Continuing of table 1

№ п/п	Аналит, химическое название	Режим	Элюент, соотношение (об/об)	Длина волны, нм
52.	Такролимус, (3S,4R,5S,8R,9E,12S,14S,15R,16S,18R,19R,26aS)-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-Гексагидро-5,19-дигидрокси-3-[(1E)-2-[(1R,3R,4R)-4-гидрокси-3-метоксициклогексил]-1-метилэтиленил]-14,16-диметокси-4,10,12,18-тетраметил-8-(2-пропенил)-15,19-эпокси-3Н-пиридо[2,1-с][1,4]-оксаза-циклотрикозин-1,7,20,21(4Н,23Н)-тетрон (в виде моногидрата)	Изократический	Ацетонитрил	215
53.	Теризидон, 1,4-бис-D(3-оксо-4-изоксазолидинилиминометил)-бензол	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 30:70	240
54.	Тилорон, 2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9Н-флуорен-9-он (и в виде дигидрохлорида)	Градиентный	Буферный раствор, содержащий 0,5% уксусной кислоты и 0,15% триэтиламина: ацетонитрил	270
55.	Торасемид, 1-(1-метилэтил)-3-[[4-[(3-метилфенил)-амино]-пиридин-3-ил] сульфонил]-мочевина	Изократический	Буферный раствор с рН 4,0 (1,9 г/л аммония уксуснокислого, доведенный до рН 4,0 ледяной уксусной кислотой): ацетонитрил, 70:30	290
56.	Трипептид (лизил-глутамил-триптофан)	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	220
57.	Убидекаренон, 2,3-диметокси-5-метил-6-декапренил-1,4-бензохинон	Изократический	Гексан: метанол 2:8	275
58.	Фелодипин, 4-(2,3-Дихлорфенил)-1,4-дигидро-2,6-диметил-3,5-пиридиндикарбоновой кислоты этилметилловый эфир	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 70:30	360
59.	Хлорогеновая кислота, соединение группы коричневых кислот, компонент экстракта кофейного дерева <i>Frangula californica</i> (Eschsch.) Gray (<i>California coffeberry</i>)	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	325
60.	Циклосерин, (R)-4-амино-3-изоксазолидинон	Изократический	Буферный раствор с рН 4,4 (0,75 г/л додекансульфоната натрия, содержащий 3,15 мл/л ледяной уксусной кислоты, доведенный до рН 4,4 0,5 Н раствором гидроксида натрия): ацетонитрил, 90:10	225
61.	Цитохром С (колонка Юпитер протео), фермент, гемопротейн с молекулярной массой около 14 кДа	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	395
62.	Ципрофлоксацин, 1-циклопропил-6-фтор-1,4-дигидро-4-оксо-7-(1-пиперазинил)-3-хинолинкарбоновая кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 82:18	280
63.	Эфавиренз, (4S)-6-Хлор-4-(циклопропилэтинил)-1,4-дигидро-4-(трифтор-метил)-2Н-3,1-бензоксазин-2-он	Изократический	0,1 М раствор муравьиной кислоты: ацетонитрил, 30:70	245

На основании представленных данных (см. табл. 1) в 68% случаев (для 43 веществ) были подобраны изократические режимы, причем в значительном числе случаев (около 47% от числа изократических режимов или около 32% от общего числа) элюентом являлась смесь 0,03% раствора ТФУ и ацетонитрила. В 32% случаев (20 веществ) были выбраны различные градиентные режимы; смесь 0,03% раствора ТФУ и ацетонитрила также была преобладающей (75% случаев от числа градиентных режимов или около 24% от общего числа). В целом различные сочетания раствора ТФУ и ацетонитрила оказались оп-

тимальными для 40 из 63 веществ (около 63%). Преимуществами этого элюента является его простота, доступность, отсутствие негативного влияния на компоненты хроматографической системы – колонку, клапана насосов и других элементов, присущих, например, солесодержащим буферным растворам [16]. Кислые элюенты (рН 0,03% раствора ТФУ около 2,3) чаще оказываются более предпочтительными в ВЭЖХ, позволяя сместить рН элюента от области рКа анализируемых соединений и перевести ионогенные аналиты в протонированную форму (Н-форму) [5]. Современные хроматографические колонки

более устойчивы в области кислых значений pH, чем щелочных – например, используемый тип колонок Luna C18 (2) рекомендован для работы с элюентами в диапазоне pH 1,5–10 [17]. Кроме того, ТФУ является одним из ион-парных реагентов, улучшающих удерживание и хроматографический анализ ряда ионогенных, гидрофильных соединений [5].

Доминирование изократических режимов над градиентными также вполне объяснимо. Изократические режимы в целом более устойчивы, стабильны, экономичны по времени (не требуется затрат времени на возвращение и уравнивание системы в исходное состояние). Кроме того, большинство задач нацелено на анализ одного целевого компонента, поэтому довольно легко удается подобрать изократический режим, позволяющий элюировать мешающие компоненты матрицы в начале хроматограммы, а целевой аналит – в области оптимальных времен удерживания (4–8 мин). Градиентные режимы потребовались для задач, предусматривающих анализ двух и более аналитов (венлафаксин и о-десметилвенлафаксин; неларабин и 9-β-D-арабинофуранозилгуанин босвелловые кислоты), компонентов растительных экстрактов (например, икариин, катехин, схизандрин, хлорогеновая кислота) или сравнительно гидрофильных объектов со сложной структурой, способных к образованию водородных связей и т.п., элюирующихся в изократических режимах в виде несимметричных, размытых пиков (с фактором асимметрии >2,5). Для таких аналитов рационально введение ион-парных реагентов (ТФУ, триэтиламина, октансульфоновой кислоты и др.) в состав элюента. В ряде случаев оказывается достаточным наиболее простого из таких реагентов – ТФУ в сочетании с градиентным режимом со сравнительно быстрой скоростью изменения концентрации ацетонитрила (2–4,5% в минуту).

При работе с элюентами, состоящим из 0,03% раствора ТФУ и ацетонитрила, большинство использованных нами градиентных режимов включали линейное изменение содержания ацетонитрила в составе элюента от 10–20 до 50–60% за 10–15 мин. Среди изократических режимов можно выделить две группы, условно названные гидрофильными – с содержанием ацетонитрила 10–30% (10 веществ, 16% от общего числа аналитов), и гидрофобными – с содержанием ацетонитрила 50–100% (11 веществ, около 18% от общего числа аналитов).

Анализируя сведения о длинах волн детектирования, можно выделить три области УФ-спектра, используемые наиболее часто – 205–220 нм (16 веществ, около 25%), 220–254 нм (20 веществ, около 31%), 270–295 нм (23 вещества, 35%) и более 300 нм (6 веществ, 9%) (рис. 1). Выбор длин волн в более длинноволновой области (350–370 нм) является скорее исключением, обусловленным наличием у аналитов специфических максимумов поглощения в этой области (6 веществ, около 9%). В первой области наиболее часто используемой оказалась длина волны 220 нм (8 веществ), во второй и третьей областях явного лидера не выявлено. Отметим, что в третьей области одинаковое число раз (по 4 раза) выбрано несколько близких длин волн – 270, 275, 280 и 295 нм. Видимо, такая ситуация характеризует общие особенности спектров поглощения органических соединений – в большинстве случаев основные максимумы располагаются в области 220–300 нм.

Следующим этапом разработки аналитической методики после выбора оптимальных условий хроматографирования и регистрации аналитического отклика является выбор оптимального способа подготовки проб. Для биоаналитических исследований этот этап является ключевым, поскольку биопробы являются сложными комплексными матрицами. Перед их введением в ВЭЖХ-системы необходима специальная подготовка образцов, позволяющая максимально удалить компоненты, мешающие определению, и выделить целевой аналит [1, 18].

В табл. 2 и на рис. 2 представлены сведения о процедурах подготовки проб, выбранных для исследованных веществ (аналиты приведены в алфавитном порядке).

В нашей практике использованы два основных типа подготовки проб – осадительная и экстракционная (см. рис. 2).

Экстракционная пробоподготовка выбрана в 36% случаев (для 22 веществ). При этом в 2 случаях (около 9% от числа экстракционных пробоподготовок и около 3,5% от общего числа) pH среды был в кислой области (pH < 7); в 7 случаях (около 32% от числа экстракционных пробоподготовок и около 11,5% от общего числа) было выбрано pH среды в щелочной области (pH > 7) и в 13 случаях (около 59% от числа экстракционных пробоподготовок и 21% от общего числа) введения ионогенных добавок не потребовалось (pH ≈ 7). Поскольку реализация этого типа пробоподготовки предусматривает довольно трудоемкий и длительный подбор

Обзор вариантов пробоподготовки для анализа различных лекарственных препаратов в биопробах (плазма крови)

Table 2

Review of the variants of sample preparation for the analysis of various drugs in biosamples (plasma)

№ п/п	Аналит	Видопринадлежность биологической матрицы (плазмы крови)	Тип пробоподготовки	Реагенты	Соотношение проба: реагент (об/об)	Замена растворителя (±), растворитель конечной пробы
1.	Абакавир	Кролик	Экстракционная	0,5 Н раствор калия гидроксида, затем этилацетат: дихлорметан, 9:1	1:0,5 1:5	+, вода
2.	Амлодипин	Кролик	Экстракционная	Смесь диэтиловый эфир:дихлорметан 7:3	1:7,5	+, метанол
3.	Аторвастатин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	–
4.	Ацикловир	Человек	Осадительная	1% раствор хлорной кислоты	1:0,2	–
5.	Бикалутамид	Человек	Экстракционная	Хлористый метилен : диэтиловый эфир, 7:3	1:10	+, метанол
6.	Бетулин	Крыса	Экстракционная	Ацетон, затем хлороформ	1:2 1:6	+, метанол
7.	Бисопролол	Кролик, человек	Экстракционная	0,1 Н раствор натрия гидроксида, затем хлороформ	1:0,75 1:3	+, 0,03% раствор ТФУ
8.	Бортезомиб	Кролик	Осадительная	0,1% раствор муравьиной кислоты	1:3	+, метанол
9.	Босвелловые кислоты	Крыса	Экстракционная	Ацетон, затем хлороформ	1:1,5 1:2	+, метанол
10.	Букридон	Кролик, крыса	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
11.	Венлафаксин и о-десметил-венлафаксин	Человек	Экстракционная	2 Н раствор натрия гидроксида, затем этилацетат	1:0,25 1:6	+, 0,03% раствор ТФУ
12.	Витамин Е (токоферола ацетат)	Кролик	Экстракционная	Этанол, затем гексан	1:5 1:10	+, метанол
13.	Гиосцин	Крыса	Осадительная	Метанол	1:2	+, 0,03% раствор ТФУ
14.	Гопантеновая кислота	Человек	Осадительная	Метанол	1:3	+, 0,2% раствор соляной кислоты
15.	Дарунавир	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
16.	Дигидро-кверцетин	Кролик	Экстракционная	Ферментативный гидролиз, затем этилацетат	1:3	+, этанол
17.	Диклофенак	Крыса	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
18.	Доксазозина мезилат (артезин)	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
19.	Доцетаксел	Крыса	Экстракционная	Этилацетат	1:12,5	+, метанол
20.	Дутастерид	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
21.	Зидовудин	Человек	Осадительная	Метанол	1:2	+, элюент (буферный раствор с рН 3,8 : метанол, 70:30)
22.	Ибупрофен	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
23.	Изотретиноин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
24.	Иматиниб	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
25.	Иринотекан	Крыса	Осадительная	0,5 Н раствор хлорной кислоты	1:0,2	–

№ п/п	Аналит	Видопринадлежность биологической матрицы (плазмы крови)	Тип пробоподготовки	Реагенты	Соотношение проба: реагент (об/об)	Замена растворителя (±), растворитель конечной пробы
26.	Каберголин	Человек	Экстракционная, осадительная	Боратный буферный раствор с рН 10,0, затем этилацетат ацетонитрил	1:1 1:4 1:3	+, метанол, +, 0,1% раствор муравьиной кислоты
27.	Катехин	Крыса	Экстракционная	Этилацетат	1:3	+, 50% раствор соляной кислоты : этанол 1:1
28.	Кверцетин	Крыса	Экстракционная	Этилацетат	1:3	+, этанол
29.	Кетопрофен	Крыса	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
30.	Клопидогрел (в виде карбоксилловой кислоты клопидогрела)	Человек	Экстракционная	2Н раствор соляной кислоты, затем гексан: диэтиловый эфир, 2:8	1:0,2 1:30	+, метанол
31.	Ламивудин	Человек	Осадительная	Метанол	1:2	+, элюент (буферный раствор с рН 3,8 : метанол, 90:10)
32.	Леветирацетам	Человек	Осадительная	0,4 М раствор хлорной кислоты	1:0,1	–
33.	Левифлоксацин	Человек	Осадительная	1 Н раствор хлорной кислоты	1:0,2	–
34.	Лейпрорелин	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
35.	Линезолид	Человек	Осадительная	Метанол	1:2	+, метанол
36.	Лозартан	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
37.	Лютеин	Крыса	Экстракционная	Этанол, затем гексан	1:1 1:2	+, метанол
38.	Мелатонин	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
39.	Метокситиозонид	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
40.	Миртазапин	Человек	Экстракционная	25 % раствор аммиака, затем гексан	1:0,1 1:5	+, метанол
41.	Моксифлоксацин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
42.	Неларабин и 9-β-D-арабинофуранозилгуанин	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, вода
43.	Рабепразол	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
44.	Ребамипид	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
45.	Рибавирин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, вода
46.	Рisperидон	Человек	Экстракционная	0,1 Н раствор натрия гидроксида, 30% раствор натрия хлорида, затем диэтиловый эфир	1:0,3 1:0,4 1:6	+, элюент (буферный раствор с рН 6,5 : ацетонитрил, 70:30)
47.	Рифабутин	Крыса	Экстракционная	Элюент (ацетонитрил: буферный раствор с рН 4,0, 50:50), затем дихлорметан: изооктана, 2:3	1:0,5 1:2	+, метанол
48.	Силденафил	Человек	Экстракционная	0,5 Н раствор натрия гидроксида, затем дихлорметан	1:0,2 1:8	+, метанол
49.	Схизандрин	Крыса	Экстракционная	Диэтиловый эфир	1:3	+, метанол
50.	Трипептид (лизил-глутамил-триптофан)	Кролик	Осадительная	15% раствор хлорной кислоты	1:0,1	–

Продолжение табл. 2
 Continuing of table 2

№ п/п	Аналит	Видопринадлежность биологической матрицы (плазмы крови)	Тип пробоподготовки	Реагенты	Соотношение проба: реагент (об/об)	Замена растворителя (±), растворитель конечной пробы
51.	Такролимус	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, ацетонитрил
52.	Теризидон	Человек	Осадительная	Метанол	1:2	-
53.	Тилорон	Кролик	Экстракционная	Хлороформ	1:5	+, этанол
54.	Торасемид	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
55.	Фелодипин	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил, затем 10% раствор хлорной кислоты	1:1 1:1	-
56.	Убидекаренон	Крыса	Экстракционная	Метанол, затем гексан	1:1,7 1:4	+, ацетон
57.	Хлорогеновая кислота	Крыса	Осадительная	10% раствор хлорной кислоты	1:0,5	-
58.	Циклосерин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, вода
59.	Цитохром С	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил : 0,03% раствор ТФУ, 50:50	1:1	-
60.	Ципрофлоксацин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
61.	Эфавиренз	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, элюент (0,1 М раствор муравьиной кислоты : ацетонитрил, 30:70)

оптимальных условий экстракции (экстрагент, рН среды, соотношение двух фаз, время обработки и т.п.), мы применяли этот способ только при наличии хотя бы минимальных (экстрагент, соотношение) литературных сведений.

Экстракционную подготовку проб или жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) используют преимущественно в распределительном варианте. Этот способ предполагает извлечение аналита в слой органического растворителя (этилацетата, диэтилового эфира, хлороформа и др.) не смешивающегося с гидрофильной средой пробы с предварительным добавлением кислых или щелочных реагентов для создания оптимального значения рН или без такового [1]. Важную роль при выборе экстрагента играют химические свойства аналита, а изменение рН позволяет управлять их полярностью для повышения эффективности экстракции (кислоты имеют большее сродство к органической фазе при низких значениях рН, основания – при высоких). К недостаткам ЖЖЭ относят трудоемкость, времязатратность, многостадийность.

Осадительная пробоподготовка оказалась оптимальной в 64% случаев (39 веществ), причем лидирующее положение занимает осаждение ацетонитрилом – 64% от числа осадитель-

ных пробоподготовок или 42% от общего числа (25 веществ), метанол и кислотные или иные осадители оказались оптимальны в примерно одинаковом числе случаев – 6 (15,5% от числа осадительных пробоподготовок или 10% от общего числа) и 8 (20,5% от числа осадительных пробоподготовок или 13% от общего числа) соответственно (см. табл. 2, рис. 2). Осаждение белков является наиболее простым, универсальным и достаточно эффективным способом подготовки биопроб к ВЭЖХ-анализу [3, 19]. Этот способ позволяет удалить до 98% протеинов плазмы крови [18]. Процедура является быстрой недорогой, простой в исполнении и может быть применена для широко спектра аналитов [19]. В качестве осадителей обычно используют растворы кислот (трихлоруксусной, хлорной, муравьиной и др.), метанол, ацетонитрил, реже соли и другие реагенты. Метанол и ацетонитрил используют наиболее часто, поскольку эти растворители хорошо смешиваются с гидрофильной средой биопроб (плазмы крови), легко удаляются (процедура пробоподготовки часто предусматривает замену растворителя, необходимую для компенсации разбавления пробы осадителем), оптимальны для последующего перерастворения проб и совместимы с элюентами, используемыми в ВЭЖХ.

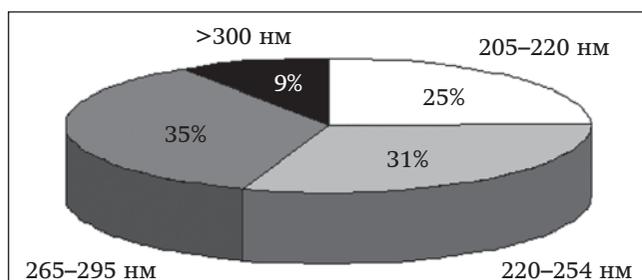


Рис. 1. Диаграмма распределения длин волн детектирования по областям УФ-спектра

Fig. 1. A distribution diagram for wavelengths of detection by the UV regions

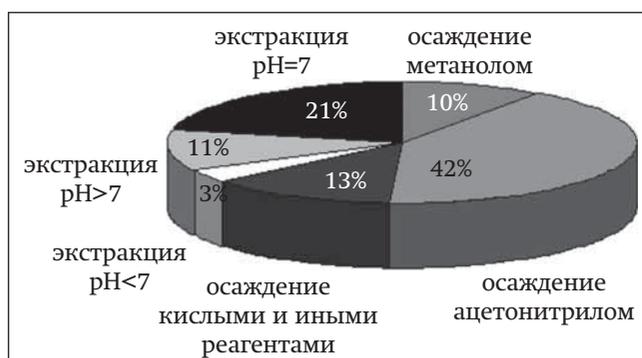


Рис. 2. Диаграмма распределения по типам подготовки проб

Fig. 2. A distribution diagram by the types of sample preparation

Все разработанные методики были надлежащим образом валидированы в соответствии с требованиями руководств (ICH Q2A Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures; ICH Q2B Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology; Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP 192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011; Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2001). Основными валидационными параметрами методик количественного определения лекарственных веществ в плазме крови являлись селективность, нижний предел количественного определения (НПКО), калибровочный диапазон, точность, прецизионность, стабильность аналита. По всем валидационным параметрам были получены результаты, удовлетворяющие предъявляемым требованиям. Концентрации, соответствующие

НПКО для большинства аналитов находилось в диапазоне 0,01–0,1 мкг/мл, что согласуется с литературными данными [2, 3] и характеризует уровень чувствительности биоаналитических методик с применением метода ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Заключение

Выявленные особенности могут быть применены в дальнейшем к более широкому кругу аналитов при создании и совершенствовании биоаналитических методик с применением метода ВЭЖХ-УФ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Медведев Ю.В., Раменская Г.В., Шохин И.Е., Ярушок Т.А. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор). Химико-фармацевтич. журнал. 2013; 47 (4): 45–51 [Medvedev YU.V., Ramenskaya G.V., Shohin I.E., Yarushok T.A. VEZHKh i SVEZHKh kak metody dlya opredeleniya lekarstvennykh veshchestv v krovi (obzor). Himiko-farmaceutich. zhurnal. = Pharmaceutical chemistry journal. 2013; 47 (4): 45–51 (in Russian)].
2. Рейхарт Д.В., Чистяков В.В. Высокочувствительные аналитические методы в оценке биоэквивалентности лекарственных препаратов (обзор). Химико-фармацевтич. журнал. 2009; 43 (12): 39–46. [Rejhart D.V., Chistyakov V.V. Vysokochuvstvitel'nye analiticheskie metody v ocenke bioekvivalentnosti lekarstvennykh preparatov (obzor). Himiko-farmaceutich. zhurnal. = Pharmaceutical chemistry journal. 2013; 2009; 43 (12): 39–46 (in Russian)].
3. Рейхарт Д.В., Чистяков В.В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях. Казанский мед. журнал. 2010; 91 (4): 532–6. [Rejhart D.V., Chistyakov V.V. Analiz lekarstvennykh sredstv pri farmakokineticheskikh issledovaniyah. Kazanskij med. zhurnal. 2010; 91 (4): 532–6] (in Russian)].
4. Wada M., Alkhalil S.M., Nakashima K. Current HPLC methods for determination of medicaments in formulations and biological samples. Jordan journal of Pharmaceutical Sciences. 2008; 1 (1): 1–27.
5. HPLC for pharmaceutical scientists. Ed. by Y. Kazakevich, R. Lobrutto. N.-Y.: Willey and sons. 2007; 1135.
6. Карлина М.В., Пожарицкая О.Н., Косман В.М., Иванова С.А. Изучение биологической доступности босвеллиевых кислот: In vitro/in vivo корреляция. Химико-фармацевтич. журнал. 2007; 41 (11): 38–41. [Karlina M.V., Pozharickaya O.N., Kosman V.M., Ivanova S.A. Izuchenie biologicheskoy dostupnosti bosvellievyykh kislot: In vitro/in vivo korrelyaciya. Himiko-farmaceutich. zhurnal. = Pharmaceutical chemistry journal. 2007; 41 (11): 38–41 (in Russian)].

7. Карлина М.В., Пожарицкая О.Н., Косман В.М., Шиков А.Н., Лазукина М.А., Дьячук Г.И. Исследование фармакокинетики гопантеновой кислоты при введении внутрь. Эксперим. и клин. фармакология. 2010; 73 (8): 46–8. [Karlina M.V., Pozharitskaya O.N., Kosman V.M., Shikov A.N., Lazukina M.A., D'yachuk G.I. Issledovanie farmakokinetiki gopantenovoy kisloty pri vvedenii vnutr'. Ekspirim. i klin. Farmakologiya. 2010; 73 (8): 46–8 (in Russian)].
8. Карлина М.В., Пожарицкая О.Н., Косман В.М., Макарова М.Н., Шиков А.Н., Макаров В.Г., Забозлаев А.А. Экспериментальная фармакокинетика препарата Валеокор-Q10. Фармация. 2012; 8: 35–7. [Karlina M.V., Pozharitskaya O.N., Kosman V.M., Makarova M.N., Shikov A.N., Makarov V.G., Zabozlaev A.A. Eksperimental'naya farmakokinetika preparata Valeokor-Q10. Farmatsiya. 2012; 8: 35–7 (in Russian)].
9. Карлина М.В., Косман В.М., Пожарицкая О.Н., Балабаньян В.Ю., Шиков А.Н., Макаров В.Г. Экспериментальное исследование фармакокинетики рифабутина в липосомальной форме. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2013; 1 (6): 37–41. [Karlina M.V., Kosman V.M., Pozharitskaya O.N., Balaban'yan V.YU., Shikov A.N., Makarov V.G. Eksperimental'noe issledovanie farmakokinetiki rifabutina v liposomal'noj forme. Farmakokinetika i farmakodinamika. 2013; 1 (6): 37–41 (in Russian)].
10. Карлина М.В., Косман В.М., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н., Макаров В.Г. Фармакокинетика схизандрола А на крысах при введении масляного экстракта лимонника. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014; 1: 34–9 [Karlina M.V., Kosman V.M., Pozharitskaya O.N., Shikov A.N., Makarov V.G. Farmakokinetika skhizandrola A na kryсах pri vvedenii maslyanogo ekstrakta limonnika. Razrabotka i registratsiya lekarstvennyh sredstv. 2014; 1: 34–9 (in Russian)].
11. Karlina M.V., Pozharitskaya O.N., Shikov A. N., Kosman V. M., Makarova M.N., Makarov V.G. LC Method for Quantification of Lutein in Rat Plasma: Validation, and Application to a Pharmacokinetic Study. Chromatographia, 2008; 68 (11–12): 949–54. DOI: 10.1556/AChrom.23.2011.3.3
12. Pozharitskaya O.N., Karlina M.V., Shikov A N., Kosman V.M., Makarova M.N., Makarov V.G. Determination of icariin in rat plasma by reverse-phase high-performance liquid chromatography after oral administration of lipid-based suspension of Epimedium koreanum extract. Biomed. Chromatogr. 2008; 22: 625–9. DOI: 10.1002/bmc.978
13. Pozharitskaya O.N., Karlina M.V., Shikov A.N., Kosman V.M., Makarova M.N., Makarov V.G. Determination and pharmacokinetic study of taxifolin in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography. Phytomedicine. 2009; 16: 244–51. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.10.002
14. Pozharitskaya O.N., Kosman V.M., Karlina M. V., Shikov A.N., Makarov V.G., Djachuk G. Method development and validation of an HPLC assay for the detection of hopantenic acid in human plasma and its application to a pharmacokinetic study on volunteers. Acta chromatographica. 2011; 23: 403–14.
15. Pozharitskaya O.N., Karlina M.V., Shikov A.N., Kosman V.M., Makarov V.G., Rosenholm J. Pharmacokinetics and Tissue Disposition of Betulin after Endotracheal Administration to Rats. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 2017; 42: 327–32. DOI: 10.1007/s13318-016-0340-7
16. Садек П. Растворители для ВЭЖХ/ Пер. с англ. А.А. Горбатенко и Е.И. Ревинной. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006; 704. [Sadek P. Rastvoriteli dlya VEZHKH/ Per. s angl. A.A. Gorbatenko i E.I. Revinoj. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2006; 704 (in Russian)].
17. Chromatography product guide 2016–17. Phenomenex, USA. 2016; 408.
18. Majors R.E. Sample preparation fundamentals for chromatography. Agilent Inc: Canada, 2013; 364.
19. Alshammari T.M., Al-Hassan A.A., Hadda T.B., Aljofan M. Comprasion of different serum sample extraction metods and their suitability for mass spectrometry analysis. Saudi pharmaceutical journal. 2015; 63: 689–97.

Поступила 2 сентября 2019 г.

Received 2 September 2019

Принята к публикации 19 декабря 2019г.

Accepted 19 December 2019