На правах рукописи

ФЕДОРОВА ГАЛИНА АФАНАСЬЕВНА

Оптимизация метода ВЭЖХ для терапевтического лекарственного мониторинга противосудорожных препаратов, метотрексата и циклоспорина А

Специальность 05.11.11. – хроматография и хроматографические приборы

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Иркутск
2003

Работа выполнена в Лимнологическом институте Сибирского отделения РАН.

Научный руководитель: доктор химических наук
Г.И.Барам

Научный консультант кандидат медицинских наук
А.В.Стародубцев

Официальные оппоненты: доктор химических наук
А.В.Ларин

доктор химических наук
Л.А.Баратова

Ведущая организация: Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится 27 января 2004 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 002.246.03 в Институте физической химии РАН по адресу: 119991, Москва, Ленинский пр., д.31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физической химии РАН.

Автореферат разослан 25 декабря 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук **Л.Н.Коломиец**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы. Здравоохранение – одна из главных областей человеческой деятельности, успехи которой прямо и косвенно зависят как от уровня развития аналитической химии в общем, так и от степени внедрения наиболее передовых методов химического анализа в практику. К таким методам относится и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которая за последние 30 лет во многом определила заметный прогресс в практической медицине. Важнейшим приложением ВЭЖХ стал терапевтический лекарственный мониторинг, позволяющий оптимизировать индивидуальную дозировку лекарств, которая необходима для предотвращения побочных эффектов и повышения эффективности лечения.

ВЭЖХ как высокочувствительный и универсальный метод анализа, которому во многих случаях нет альтернативы, позволяет одновременно следить за изменением концентрации несколько лекарственных веществ (ЛВ), отличается достаточной точностью и воспроизводимостью. Однако, активное использование ВЭЖХ в повседневной (рутинной) клинической практике ограничено из-за отсутствия унифицированных методик анализа. В настоящее время для определения какого-либо ЛВ применяются своя "уникальная" процедура подготовки пробы и своя методика ВЭЖХ-анализа, которые в каждом конкретном случае предписывают использование разных колонок, разных элюентов и разных детекторов. Очевидно, что эти обстоятельства приводят к необходимости каждый раз изменять хроматографическую систему и калибровать хроматограф, что, в конечном итоге, значительно увеличивает продолжительность всего анализа, требует высокой квалификации персонала и, наконец, существенно повышает стоимость анализа.

Один из возможных путей решения этой проблемы – разработка максимально унифицированных, экономичных и экспрессных методик подготовки пробы и хроматографических процедур. Реализация такого подхода, очевидно, позволит снизить расходы на проведение анализа и широко внедрить ВЭЖХ в практику лекарственного мониторинга.

Это направление развития ВЭЖХ, безусловно, представляется нам важным и актуальным.

Цель и задачи исследований.

1. Оптимизировать метод ВЭЖХ для задач терапевтического лекарственного мониторинга препаратов в сыворотке крови с целью широкого его внедрения в клиническую практику.

2. Унифицировать и оптимизировать метод ВЭЖХ для определения ряда лекарственных веществ (метотрексат, циклоспорин А, этосуксимид, гексамидин, фенобарбитал, ламиктал, дифенин, карбамазепин, бензонал, клоназепам, депакин), которые являются важнейшими объектами терапевтического лекарственного мониторинга.

3. Унифицировать и оптимизировать процедуру подготовки образцов крови для определения в них методом ВЭЖХ вышеперечисленных препаратов.

4. Определить метрологические характеристики разработанных методик для подтверждения их соответствия требованиям, принятым для биоаналитических методов.

5. Апробировать разработанные методики в клинической практике и подтвердить их пригодность для терапевтического лекарственного мониторинга.

Научная новизна работы работы заключается в следующем:

1. Предложена унифицированная, оптимизированная и экономичная ВЭЖХ-методика для определения этосуксимида, гексамидина, фенобарбитала, бензонала, ламиктала, дифенина, карбамазепина, клоназепама и депакина (все – противосудорожные препараты), метотрексата и циклоспорина А, позволяющая хроматографировать все соединения на колонке с обращенно-фазовым сорбентом типа "С18" при использовании одной и той же двухкомпонентной подвижной фазы.

2. Предложена унифицированная и экономичная методика подготовки образца для прямого анализа этосуксимида, гексамидина, фенобарбитала, бензонала, ламиктала, дифенина, карбамазепина и метотрексата в сыворотке крови методом ВЭЖХ. Ее отличительная особенность – возможность работы с малыми объемами образцов крови. Методика подготовки образца обеспечивает достаточную степень его очистки от балластных веществ крови и позволяет проводить более 400 анализов противосудорожных препаратов в сыворотке на одной колонке, что существенно повышает экономичность всего метода.

3. Показана пригодность разработанных методик подготовки пробы и ВЭЖХ-анализа для терапевтического лекарственного мониторинга противосудорожных препаратов (ПСП), метотрексата и циклоспорина А путем апробации в рутинной клинической практике. На примере свыше 700 определений подтверждено соответствие метрологических характеристик разработанных методик требованиям, принятым для биоаналитических методов.

Практическая значимость работы.

Предложенные методики были использованы для терапевтического лекарственного мониторинга ПСП, метотрексата и циклоспорина А в крови пациентов, проходившим лечение в Иркутской Государственной областной детской клинической больнице и в Иркутском Государственном институте усовершенствования врачей в период 1997-2003 гг. Данные мониторинга в сочетании с клиническими показателями были использованы врачами для коррекции доз лекарственных препаратов.

Внедрение разработанных методик для терапевтического лекарственного мониторинга в клиническую практику позволит более обоснованно определять тактику и стратегию лечения, сделав лечение эффективнее и безопаснее.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Оптимизированная ВЭЖХ-методика для определения ПСП, метотрексата и циклоспорина А, которая является экспрессной и экономичной вследствие унификации как условий ВЭЖХ-анализа, так и применения микроколоночного варианта ВЭЖХ. Время анализа составляет 10-15 мин.

2. Методика подготовки образца для прямого анализа этосуксимида, гексамидина, фенобарбитала, бензонала, ламиктала, дифенина, карбамазепина и метотрексата в сыворотке крови, являющаяся простой, экспрессной и экономичной. Объем сыворотки крови для одного определения не превышает 50 мкл. На одной колонке выполняется более 400 анализов ПСП.

3. Результаты апробации разработанных методик подготовки пробы и ВЭЖХ-анализа в рутинной клинической практике, подтверждающие их пригодность для терапевтического лекарственного мониторинга.

4. Результаты исследования метрологических характеристик разработанных методик анализа, полученные путем обработки экспериментального

материала, подтверждающие их соответствие требованиям, принятым для биоаналитических методов анализов.

Апробация работы и публикации. Основные результаты работы изложены в 11 публикациях и доложены на: Всероссийском симпозиуме по теории и практике хроматографии и электрофореза (Москва, 1998); Всероссийском симпозиуме по химии поверхности, адсорбции и хроматографии (Москва, 1999); V Национальном Съезде фармацевтов Украины "Достижения современной фармацевтики и перспективы его развития в новом тысячелетии" (Харьков, 1999); VI Конференции "Аналитика Сибири и Дальнего Востока – 2000" (Новосибирск, 2000); VIII Всероссийском съезде неврологов (Казань, 2001); II Объединенной научной сессии СО РАН и СО РАМН (Новосибирск; 2002); X Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство", (Москва, 2003); 3-ем Международном симпозиуме по методам разделения в биологических науках (Москва, 2003).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Материал диссертации изложен на 137 страницах текста, содержит 23 рисунка, 12 таблиц и 4 приложения. В списке цитируемой литературы 127 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

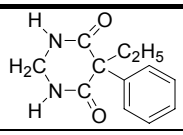
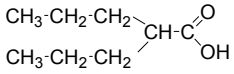
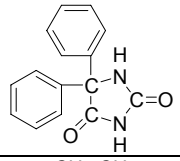
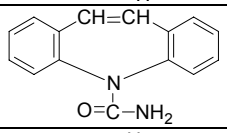
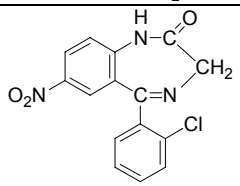
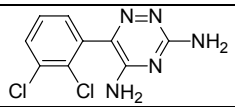
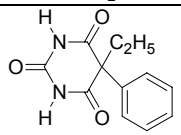
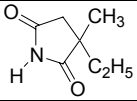
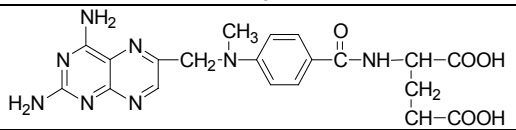
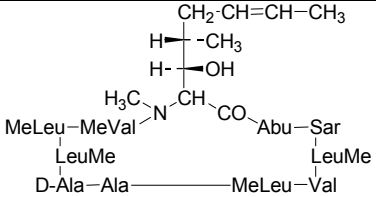
Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) как самостоятельное направление в фармакокинетическом анализе сформировался около 20 лет назад. Он представляет собой контроль концентрации лекарственного вещества (ЛВ) и/или его активных метаболитов в организме пациента в течение всего периода лечения. ТЛМ особенно важен, когда соединение имеет узкий терапевтический интервал действия, когда необходима длительная терапия, когда наблюдается нелинейная фармакокинетика и значительная вариабельность фармакокинетических параметров у разных пациентов.

В РФ список ЛВ, подлежащих мониторингу, регламентируется Приказом № 64 Минздрава РФ от 21 февраля 2000 г. Он содержит около 50 лекарств, характерная особенность которых – близость их терапевтической концентрации

к токсической. Именно это обстоятельство и яляется причиной, требующей мониторинга таких ЛВ при проведении терапии. Особенно важно осуществлять ТЛМ при лечении детей, так как дозировка сильнодействующих лекарств, выбираемая, исходя из веса больного, в большинстве случаев не может обеспечить "правильную" концентрацию ЛВ в крови.

10 лекарственных веществ, часто применяемых для лечения детей, приведены в следующей таблице 1.

Таблица 1. Терапевтические и токсические концентрации 10 ЛВ в крови.

Лекарственное вещество	Структурная формула	Концентрация, мкг/мл	
		терапевтич.	токсическая
Гексамидин		5-12	15
Вальпроевая кислота		40-100	120-150
Дифенин		5-20	20
Карбамазепин		2-12	10
Клоназепам		0,01-0,08	0,1
Ламиктал		0,5 (1)-3 (12)	2-20
Фенобарбитал		10-40 (50)	30
Этосуксимид		30-100	100
Метотрексат		0,23	0,45
Циклоспорин А		0,1-0,4	0,4

Концентрацию всех этих веществ определяют в крови, как правило, методом обращенно-фазной ВЭЖХ. В литературе для каждого из ЛВ описано много вариантов методик анализа, но реальное внедрение их в практический ТЛМ требует весьма значительных затрат, связанных с необходимостью приобретения большого количества разных колонок и реактивов. Вынужденная перестройка хроматографической системы и ее калибровка при переходе с определения одного вещества к определению другого, увеличивает продолжительность всего анализа и требует высокой квалификации персонала, что, в конечном итоге, повышает стоимость каждого анализа еще больше.

Очевидно, что при системном подходе к организации ТЛМ все разнообразие аналитических процедур необходимо свести к минимуму и оптимизировать их с экономической точки зрения.

1. Выбор масштаба ВЭЖХ.

От масштаба хроматографии, определяемого размерами колонки, зависит такой "потребительский" параметр, как количество расходуемой на один анализ подвижной фазы (ПФ).

Длина хроматографических колонок, используемых в терапевтическом лекарственном мониторинге (ТЛМ), составляет обычно 100-250 мм, а их внутренний диаметр – 4-4,6 мм. Применение коротких колонок – один из важных путей снижения стоимости анализа за счет сокращения его длительности и уменьшения расхода ПФ. Уменьшение диаметра колонки при сохранении нагрузки приводит к повышению чувствительности анализа и, тем самым, снижает требования к чистоте растворителей. Очевидно, что одновременное уменьшение длины и диаметра колонки по сравнению со "стандартной" позволяет получить существенные выгоды. Применение колонки размером ∅2х75 мм взамен традиционной (∅4,6х250 мм) в 10–20 раз снижает расход растворителей и во столько же раз повышает чувствительность определения.

ВЭЖХ на колонках ∅2х75 мм мы считаем оптимальным масштабом для целей ТЛМ. Дальнейшее уменьшение колонки до размеров капиллярной представляется нецелесообразным, так как оборудование для капиллярной

ВЭЖХ пока слишком дорого. Отметим также, что выигрыш в чувствительности определения и экономия растворителей при переходе от колонок диаметром 2 мм к колонкам диаметром 1 мм и менее, становятся уже не такими заметными.

Все хроматографические определения мы выполняли на жидкостном хроматографе "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова, г.Новосибирск).

2. Выбор неподвижной фазы.

В ТЛМ используются, главным образом, обращенные фазы (ОФ) типа "С8" и "С18", синтезированные на основе силикагеля. Известно, что практически все ОФ, даже при условии "одинаковости" их нормируемых характеристик, могут существенно различаться по селективности. Для оценки пригодности конкретных ОФ нами совместно с М.О.Родинко и И.Н.Азаровой было исследовано 7 сорбентов (частицы сферической формы с диаметром 5 мкм), упакованных в колонки ∅2х75 мм.

Так как большинство ЛВ, подлежащих ТЛМ относятся к весьма гидрофильным соединениям, было изучено поведение ОФ в бинарном элюенте с высоким содержанием воды. Для этого в режиме градиентного элюирования записывали хроматограммы экстракта черного чая, содержащего большое количество гидрофильных веществ. Показано, что градиентное элюирование с начальной концентрацией ацетонитрила 2% возможно лишь для двух фаз – Nucleosil 100-5-C18 (рис. 1 В) и Nucleosil 300-5-C8 (рис. 1 Г). Остальные ОФ при таком высоком содержании воды в ПФ "коллапсировали". Это явление характерно для фаз с высоким содержанием углерода (полимерные фазы) или с предельно высокой плотностью прививки алкильных радикалов. В данном случае такими ОФ оказались Nucleosil 100-5-C18 AB и PAH, Kromasil 100-5-C4, C8 и C18. Снижение содержания воды в ПФ с 98 до 90% в начале градиента лишь частично "снимает" коллапс сорбента Kromasil C18 (рис. 13).

Комплексную проверку пригодности ОФ Nucleosil 100-5-C18 для определения веществ различной химической природы мы проводили с помощью тестовой смеси, которую хроматографировали в градиентном режиме (рис. 2). Два ее компонента – прозерин и трифтазин – содержащие основной атом азота, весьма чувствительны к наличию неэкранированных силанольных групп

сорбента. Оба вещества на выбранном сорбенте хроматографируются в виде симметричных пиков с коэффициентами асимметрии $A_{10\%}$=1,15-1,19, что говорит об отсутствии значимых ионообменных взаимодействий с силанолами.

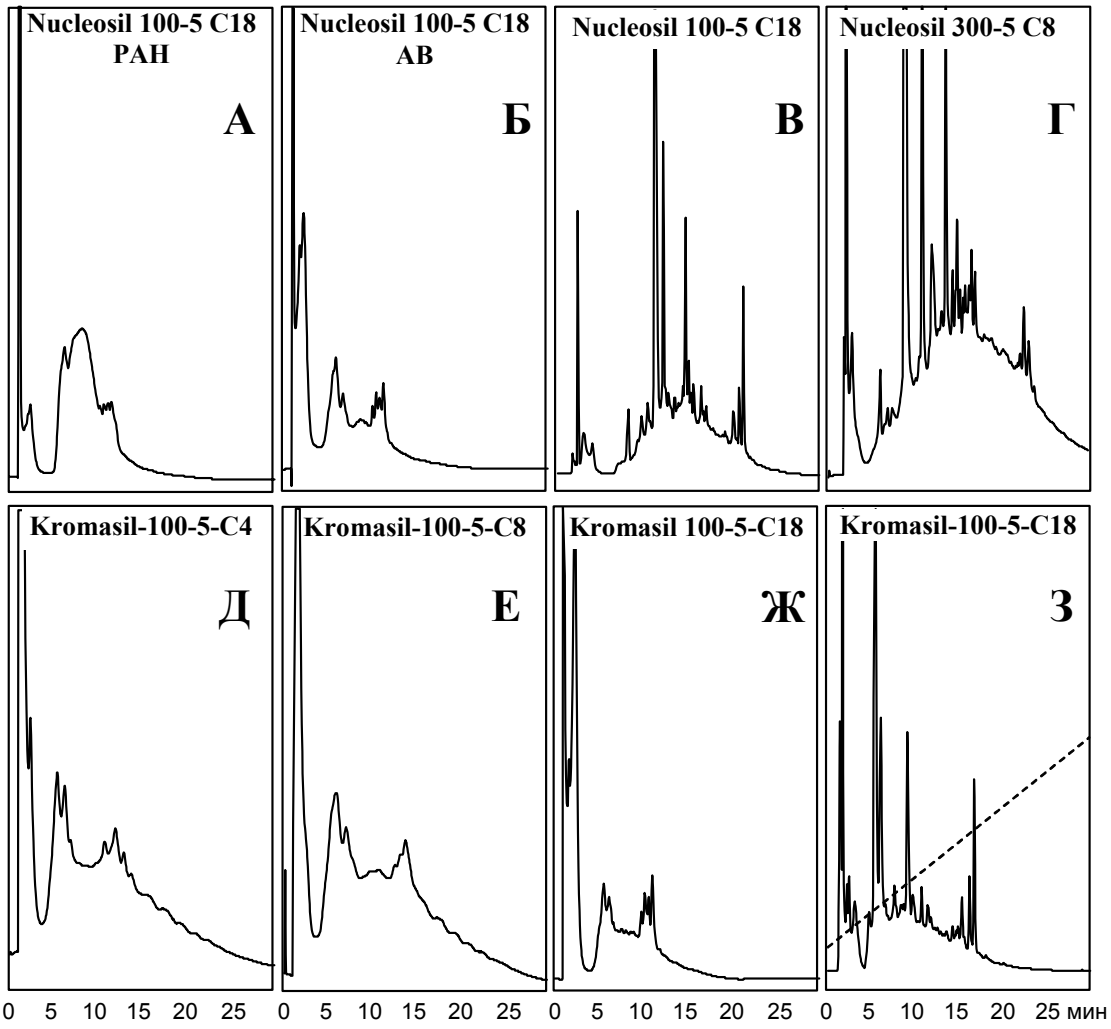


Рис. 1. Определение гидрофильных соединений на различных ОФ. Колонки: ∅2х75 мм. Элюенты: "А"- 0,2 М $LiClO_4$ - H_3PO_4 (pH 3); "Б"- MeCN. Градиенты: **А-Ж** - 3000 мкл от 2 до 50% "Б"; **З** - 3000 мкл от 10 до 50% "Б". Скорость потока: 100 мкл/мин. Температура: 45°С. УФ-детектор: λ=280 нм. Проба: 2 мкл экстракта черного чая; экстрагент - этанол:вода (1:1).

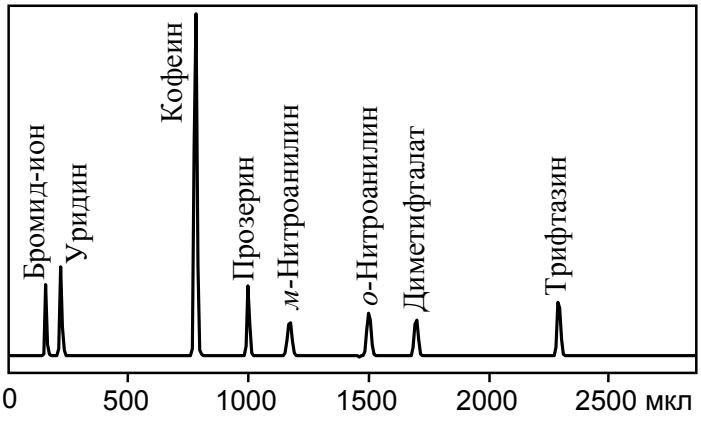


Рис. 2. Хроматограмма тестовой смеси.

Колонка: 2х75 мм; Nucleosil 100-5 C18. Элюенты: А- 0.2 М $LiClO_4$-H_3PO_4, pH 3; Б - ACN. Градиент: 4000 мкл от 5 до 100% Б; 300 мкл 100% Б. *F*: 100 мкл/мин. *t*: 40°С. λ=210 нм. Проба: 5 мкл.

3. Выбор подвижной фазы.

Хорошая симметрия пиков на рис. 2 обусловлена также кислым значением pH элюента и присутствием в нем $LiClO_4$. ВЭЖХ-анализ ЛВ на ОФ часто выполняется при pH~3, однако, при длительной эксплуатации колонки при таком значении pH существует опасность отщепления от силикагеля радикалов C18 с образованием свободных силанольных групп. Для того, чтобы заранее подавить эффект "силанолов", мы увеличили ионную силу ПФ, введя в ее состав $LiClO_4$. Выбор оптимальной концентрации $LiClO_4$ в ПФ выполнен нами совместно с М.О.Родинко экспериментально путем изучения поведения 6 веществ при градиентном элюировании. Концентрацию $LiClO_4$ в элюенте А изменяли от 0 до 0,5 М. Зависимости объемов удерживания и ширины пиков на половине их высот от концентрации $LiClO_4$ приведены на рис. 3-I и II.

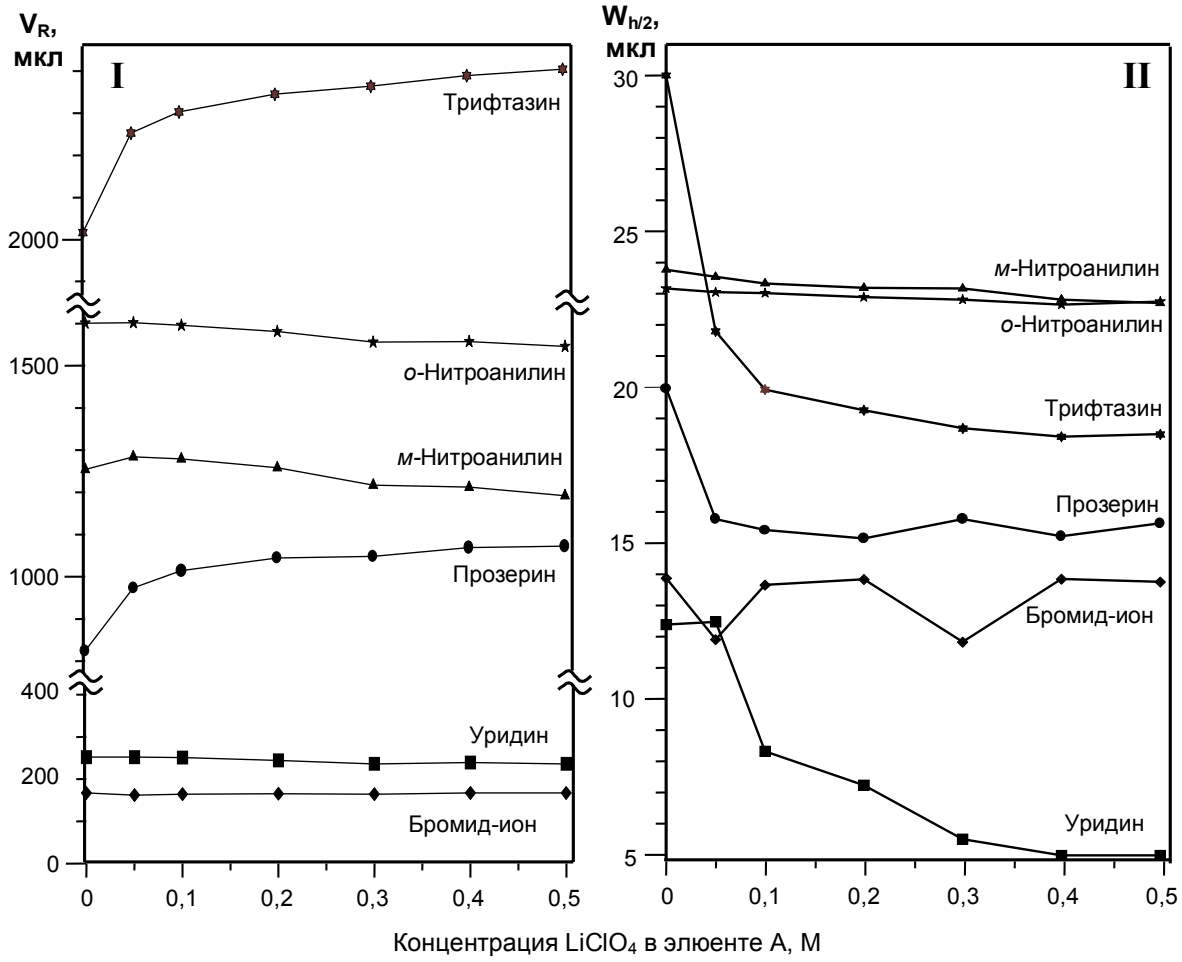


Рис. 3. Зависимость объемов удерживания и ширины пиков на уровне h/2 компонентов тестовой смеси от концентрации перхлората лития в ПФ. Условия хроматографии в подписи к рис. 2.

Из кривых на рис. 3-I и II видно, что изменение концентрации $LiClO_4$ заметно влияет на подвижность только прозерина и трифтазина, являющихся основаниями с pK_a>8. Увеличение их удерживания можно связать с образованием слабогидрофобных ионных пар с ClO_4^-. Изменение концентрации $LiClO_4$ лития от 0 до 0,2 М вызывает уменьшение ширины пиков уридина, прозерина и трифтазина. Концентрация $LiClO_4$ в элюенте А, равная 0,2 М выбрана нами как оптимальная.

Далее нами показано, что все 10 веществ из Табл. 1, выбранные в качестве аналитов для ТЛМ, хорошо хроматографируются на колонке ∅2х75 мм с ОФ Nucleosil 100-5 C18 в подвижной фазе 0.2 М $LiClO_4$-H_3PO_4 (pH 3) – ацетонитрил в изократическом или градиентном режимах.

4. Изократическое и градиентное элюирование.

Изократическое элюирование по сравнению с градиентным по многим причинам всегда предпочтительнее. В тех случаях, когда это допускалось, мы этому следовали. В Табл. 2 для приведены оптимальные составы ПФ для изократического ВЭЖХ противосудорожных препаратов (ПСП). ПФ готовили путем смешивания элюентов А (0.2 М $LiClO_4$-H_3PO_4 (pH 3) и Б (ацетонитрил).

Таблица 2. Состав ПФ для определения ПСП и значения k' и $A_{10\%}$.

Лекарственное вещество	Определяемое соединение	Элюент А / Элюент Б	k'	Коэффициент асимметрии, $A_{10\%}$
Фенобарбитал	Фенобарбитал	80:20	5,21	1,12
Бензонал	Фенобарбитал	80:20	5,21	1,12
Карбамазепин	Карбамазепин	70:30	4,49	1,12
Гексамидин	Гексамидин	85:15	3,94	1,12
	Фенобарбитал	85:15	10,61	1,12
Ламиктал	Ламиктал	80:20	5,66	1,02
Дифенин	Дифенин	70:30	4,61	1,12
Клоназепам	Клоназепам	65:35	4,06	1,15
Этосуксимид	Этосуксимид	90:10	4,14	1,15
Вальпроевая кислота (ВК)	*пара*-бромфенацилбромид ВК	35:65	6,16	1,08

Градиентное элюирование применяли для одновременного определения в крови нескольких ЛВ при комплексной терапии. Иллюстрация разделяющей способности градиентной ВЭЖХ по отношению к ПСП приведена на рис. 4.

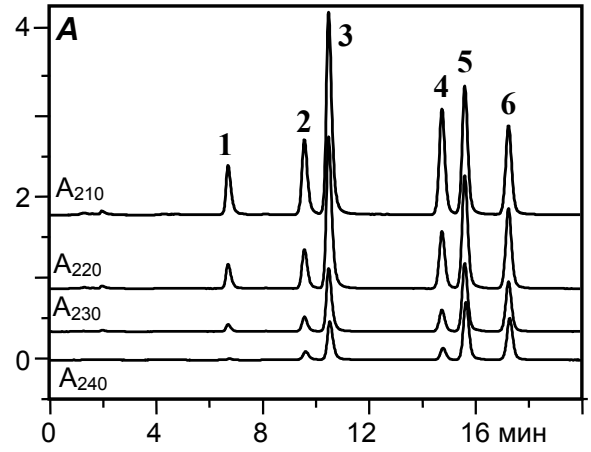


Рис. 4. Хроматограмма смеси ПСП.
Колонка: 2х75 мм; Nucleosil 100-5 C18.
Элюент А: 0.2 М $LiClO_4$-H_3PO_4, pH 3.
Элюент Б: ACN. Градиент: 2000 мкл от 10 до 30% Б. *F*=150 мкл/мин. *t*=55ºС.
λ=210, 220, 230, 240 нм.
Проба: 2 мкл стандартного раствора:
1– гексамидин; **2**– фенобарбитал;
3 – ламиктал; **4**– дифенин;
5– карбамазепин; **6**– клоназепам.

При мониторинге метотрексата и циклоспорина А градиентный режим применяли для повышения чувствительности их определения. Она повышалась примерно в 3 раза для метотрексата (рис. 5) и в 2 раза для циклоспорина А.

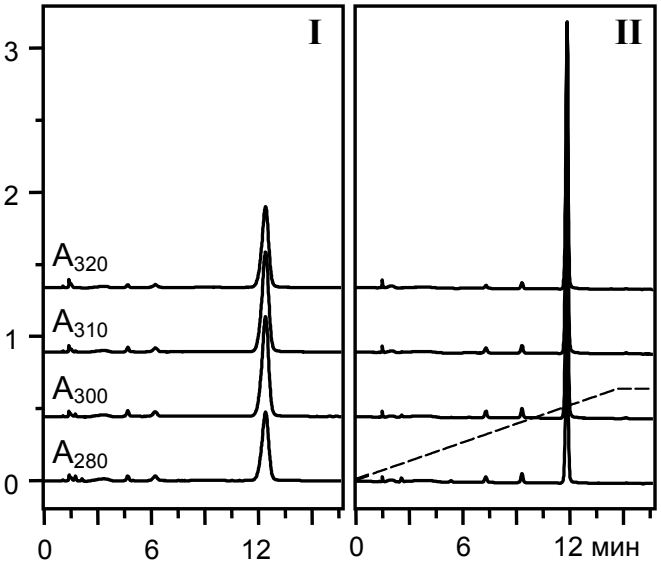


Рис. 5. Хроматограммы метотрексата при изократическом (**I**) и градиентном (**II**) элюировании.
Колонка: 2х75 мм;
Nucleosil 100-5 C18.
Элюенты: А- 0.2М $LiClO_4$ - H_3PO_4, pH3; Б- MeCN.
Подвижные фазы:
I- 10% Б;
II- градиент: 2200 мкл от 5% до 20% Б; 500 мкл 20% Б.
F=150 мкл/мин. *t*=40°С.
Проба: 2 мкл водного раствора метотрексата (0,5 мг/мл).

5. Выбор длин волн при фотометрическом детектировании ЛВ.

Длину волны детектирования определяли, исходя из УФ-спектра ЛВ. Чаще всего такой длиной волны являлась длина волны, соответствующая $\lambda_{макс}$ раствора вещества или близкая к ней. Вальпроевая кислота не поглощает в УФ-области спектра. Ее анализировали в виде УФ-поглощающего производного – *пара*-бромфенацилбромида.

Для повышения надежности идентификации веществ применяли многоволновое детектирование. Идентификацию проводили по спектральным отношениям (отношения площадей пиков при разных длинах волн), вычисляемые с помощью программы "МультиХром" (ЗАО "Амперсенд", г.Москва).

В тех случаях, когда определяли ЛВ, поглощающие в длинноволновой области УФ-спектра, то элюат детектировали при "длинных" λ, так как это позволяло минимизировать мешающее влияние эндогенных соединений крови. Детектирование клоназепама при λ=310 нм позволяет уменьшить мешающее влияние карбамазепина в случае комплексной терапии.

Таблица 3. Длины волн максимального поглощения и детектирования ЛВ. Растворитель – элюент (MeCN-0,2 M $LiClO_4$ – H_3PO_4, pH 3).

ЛВ	$\lambda_{мах}$, нм	$\lambda_{дет}$, нм
Фенобарбитал	194	210, 220, 230, 240
Карбамазепин	214, 284	210, 220, 230, 240
Гексамидин	194	210, 220, 230, 240
Ламиктал	212, 266	210, 220, 230, 240
Дифенин	198	210, 220, 230, 240
Клоназепам	196, 310	310, 320, 330, 340
Этосуксимид	196	196, 200, 210, 220
Вальпроевая кислота	200, 256	250, 260, 270, 280
Циклоспорин А	200	200, 204, 210, 214
Метотрексат	202, 304	280, 300, 310, 320

Целесообразность привлечения спектральных отношений для идентификации вещества видно на примере циклоспорина А, пик которого плохо отделяется от веществ крови (рис. 6).

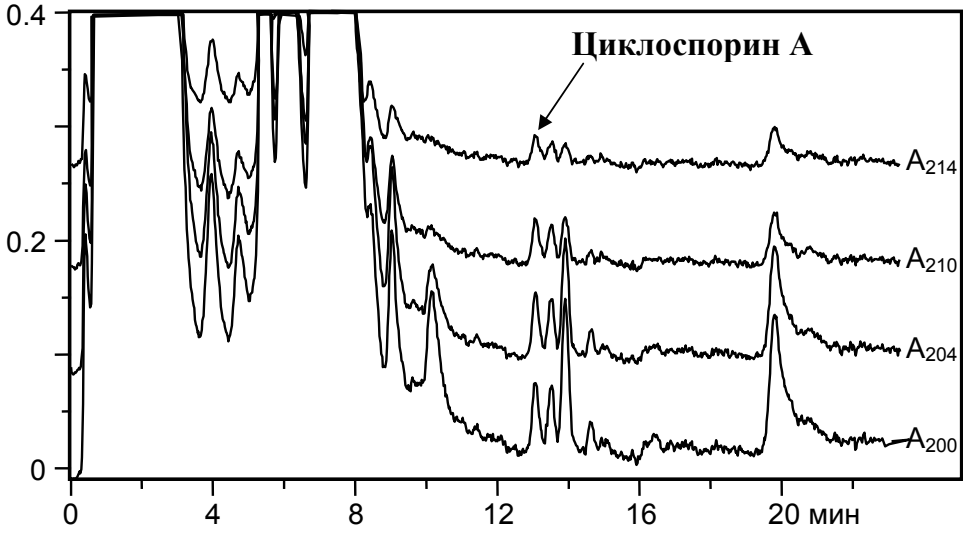


Рис. 6. Хроматограмма экстракта сыворотки крови пациента, принимающего циклоспорин А (200 мг/сутки).

Колонка: 2х75 мм; Nucleosil 100-5 C18. Элюенты: А- 0.2 M $LiClO_4$ - H_3PO_4, pH 3; Б- MeCN. Градиент: 2500 мкл от 50% Б до 80% Б, 1000 мкл 80% Б. *F*=150 мкл/мин. *t*=70°С.Объем пробы: 100 мкл. Концентрация циклоспорина А в сыворотке составила 98±10 мкг/мл.

Сравнение спектральных отношений S_{204}/S_{200} и S_{210}/S_{200}, вычисленных для пиков циклоспорина А в стандарте и в пробе приведены ниже:

Спектральные отношения:	S_{204}/S_{200}	S_{210}/S_{200}
Циклоспорин А (проба)	0,918	0,626
Циклоспорин А (стандарт)	0,938	0,658

6. Температура колонки.

В практике ТЛМ ВЭЖХ-анализ проводят, как правило, при комнатной температуре, видимо, "экономя" на термостате колонки. Однако, термостатирование колонки необходимо не только для лучшей воспроизводимости времен удерживания пиков, но и для решения проблем, связанных с разделением пиков ЛВ, применяемых при комплексной терапии. Так, на рис. 7 показано изменение селективности хроматографической системы при нагревании колонки от 35 до 55ºС для пар ПСП "ламиктал-фенобарбитал" "дифенин-карбамазепин".

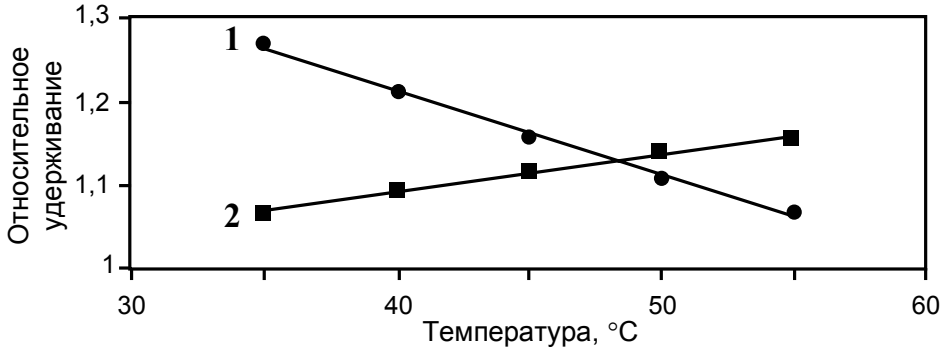


Рис. 8. Влияние температуры колонки на селективность разделения.
1- "ламиктал-фенобарбитал"; **2**- "дифенин-карбамазепин".

Нагрев колонки до 70ºС имеет решающее значение для определения циклоспорина А. При более низких температурах он элюируется несимметричным пиком (рис. 9).

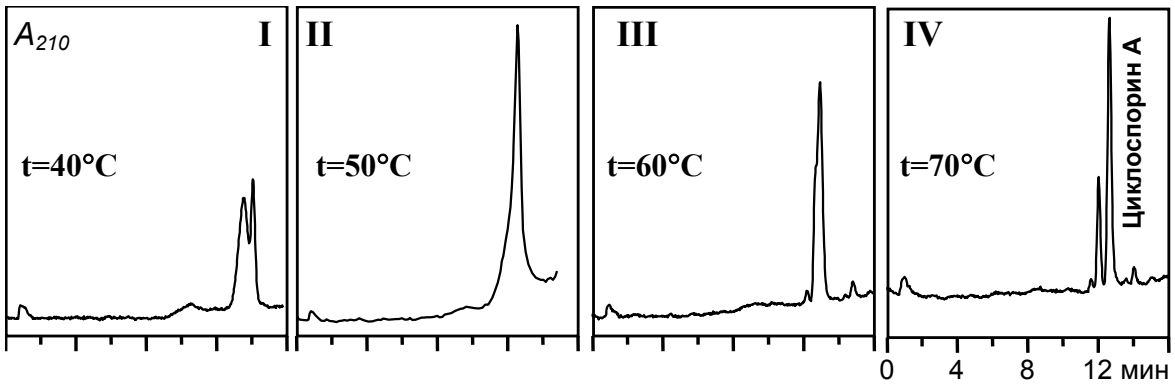


Рис. 9. Хроматограммы циклоспорина А (Neoral) при разных температурах.
Условия разделения в подписи к рис. 6.

7. Подготовка образца сыворотки крови.

Подготовка образца крови для ТЛМ методом ВЭЖХ является важнейшей процедурой, с одной стороны, во многом определяющей правильность получаемых результатов, а с другой – время "жизни" колонки. Последнее связано с проблемой удаления из сыворотки крови липидов и белков.

Липиды, сорбируясь на фазе С18, уменьшают емкость колонки. Полное удаление их из колонки возможно лишь только при промывке ее такими растворителями, как ацетон, гексан, хлороформ, что, как правило, неудобно. Предварительная обработка пробы гексаном позволяет удалить часть таких соединений. Нами показано, что гексан извлекает из 1 мл сыворотки крови в нейтральной среде (сыворотка:гексан=1:5; $pH_{сыв.} \approx 7$) от 0,8 до 1,2 мг липидов. Это составляет 10-20 % от их общего количества.

Более полное извлечение липидов возможно при экстракции гексаном из кислой среды (pH 2) после осаждения белков ацетонитрилом. Такой прием используется, например, при определении циклоспорина А в сыворотке крови.

На рис. 10 приведены хроматограммы сыворотки крови после осаждения белков ацетонитрилом без обработки гексаном (**I**) и после экстракции гексаном из нейтральной (**II**) и кислой среды (**III**).

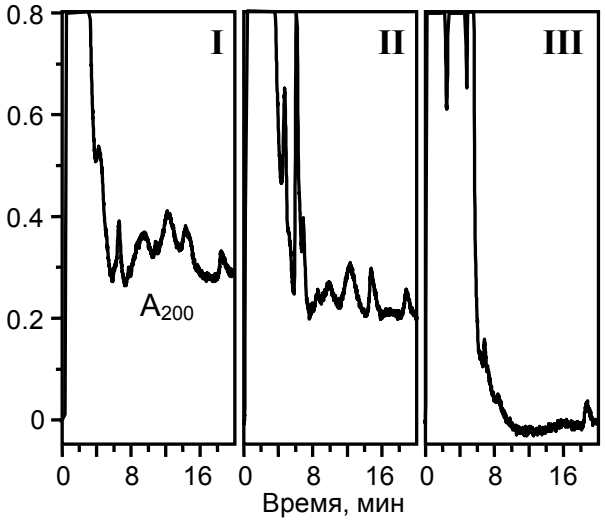


Рис. 10. Хроматограммы сыворотки после разных способах обработки пробы.
I- без обработки;
II– после экстракции гексаном, pH 7;
III– после экстракции гексаном, pH 2.
Колонка: 2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18. Элюент А: 0.2 М $LiClO_4$-H_3PO_4, pH 3. Элюент Б: ACN. Градиент: 2500 мкл от 50 до 80% Б; 1000 мкл 100% Б. F=150 мкл/мин. t=70°С. λ=200 нм. Проба: 100 мкл сыворотки.

Более высокое оптическое поглощение элюата на рис. 10(**I**) и (**II**) в области 6-18 мин свидетельствует о большей концентрации УФ-поглощающих гидрофобных соединений в хроматографируемом образце.

Белки, присутствующие в большом количестве в сыворотке крови, чаще всего в ТЛМ осаждают, используя, например, ацетонитрил при различных

соотношениях "ацетонитрил-сыворотка". В нашей работе мы выбрали соотношение "ацетонитрил-сыворотка"=1:1, так как при увеличении соотношения до 2:1 степень осаждения белка возрастает незначительно, а меньшее соотношение "ацетонитрил-сыворотка" ведет к меньшему разбавлению пробы и позволяет вводить пробу из растворителя с более высокой полярностью, что обеспечивает лучшую эффективность разделения.

При осаждении белков важным параметром является консистенция образующегося осадка, который требуется отделить от раствора. Для получения после центрифугирования достаточно уплотненного осадка мы 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. Экспериментальные данные приведены в таблице 9.

Таблица 4. Зависимость консистенции осадка от концентрации $LiClO_4$.

Концентрация $LiClO_4$ в пробе, М	Консистенция осадка
0.5	Плотный
0.4	Плотный
0.3	Плотный
0.2	Рыхлый
0.1	Рыхлый

При мониторинге клоназепама, концентрация которого в сыворотке крови мала и составляет 40-70 нг/мл, требуется стадия предварительного концентрирования, например, экстракция хлористым метиленом. Ее проводили после удаления из сыворотки липидов. Степень извлечения клоназепама (50 нг/мл) из сыворотки при двукратной экстракции и соотношении сыворотка:экстрагент=1:1 составила в среднем 99%. Подобным же образом экстрагировали из сыворотки циклоспорин А, но после осаждения белков.

Разработанные нами процедуры подготовки сыворотки для определения ЛВ методом ОФ ВЭЖХ, несмотря на свою простоту, обеспечивают проведение на одной колонке более 400 анализов без существенного уменьшения ее эффективности и заметного увеличения ее гидродинамического сопротивления.

Примеры определения лекарственных веществ в сыворотке крови пациентов приведены на рис. 11-17.

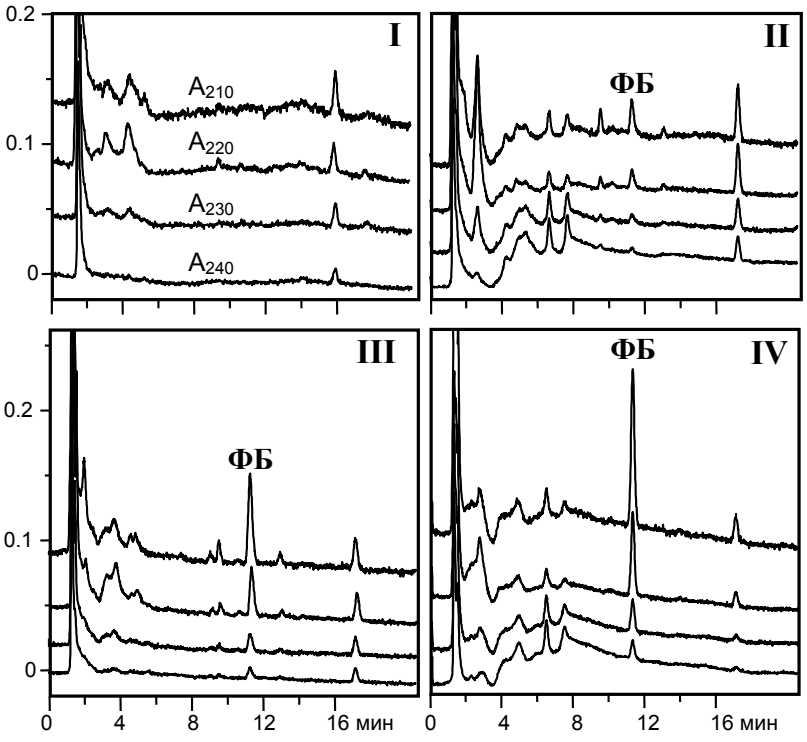


Рис. 11. Определение фенобарбитала (**ФБ**) в сыворотке крови.
I– холостая проба;
II– $C_{ФБ}$=5,8 мкг/мл;
III– $C_{ФБ}$=22 мкг/мл;
IV– $C_{ФБ}$=33 мкг/мл.

Колонка: 2х75 мм; Nucleosil 100-5 C18. Элюенты: А- 0.2М $LiClO_4$-H_3PO_4, pH3; Б: ACN. Градиент: 2000 мкл от 10% Б до 30% Б, 1000 мкл 30% Б. *F*=150 мкл/мин. *t*=40°C. λ=210, 220, 230, 240 нм. Проба: 2 мкл обработанной сыворотки крови.

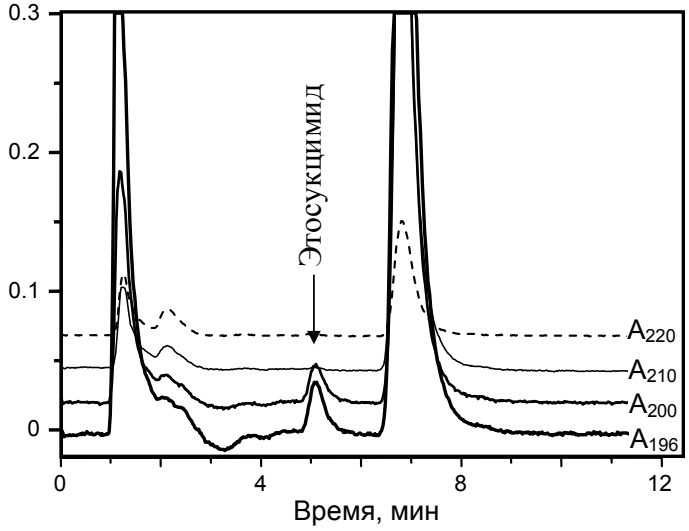


Рис. 12. Определение этосуксимида в сыворотке.

Концентрация этосуксимида в исходной сыворотке 28 мкг/мл.

Колонка: 2х75 мм; Nucleosil 100-5 C18. Элюент А: 0.2 М $LiClO_4$-H_3PO_4, pH 3. Элюент Б: ACN. Подвижная фаза: 10% Б. *F*=150 мкл/мин. *t*=40°C. Проба: 2 мкл

Часть из этих хроматограмм являются примером использования ВЭЖХ при комплексной терапии. На рис. 13 приведена хроматограмма обработанной сыворотки пациента, проходящего лечение гексамидином. В организме гексамидин медленно превращается в фенобарбитал. На практике мониторинг гексамидина часто ведут только по концентрации фенобарбитала, так как фенобарбитал обладает большей противосудорожной активностью по сравнению с гексамидином. Мониторинг фенобарбитала основан, как правило, на иммунологических методах. ВЭЖХ позволяет одновременно определять как исходный гексамидин, так и его активный метаболит – фенобарбитал.

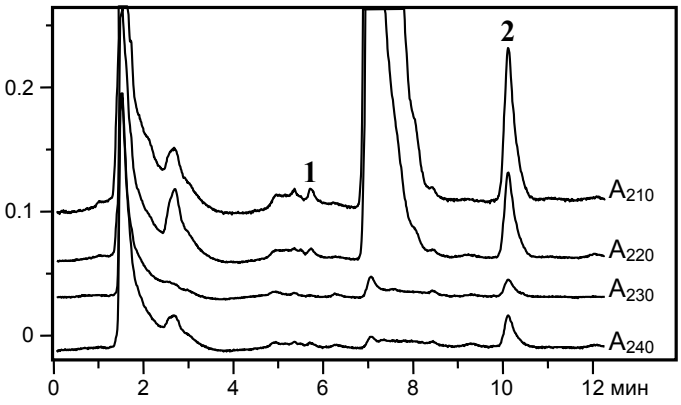


Рис. 13. Хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента, принимающего лечение гексамидином.
1 – гексамидин (2,9±0,2 мкг/мл);
2 - фенобарбитал (36±2 мкг/мл).

Условия разделения как на рис. 11. Проба: 5 мкл обработанной сыворотки крови.

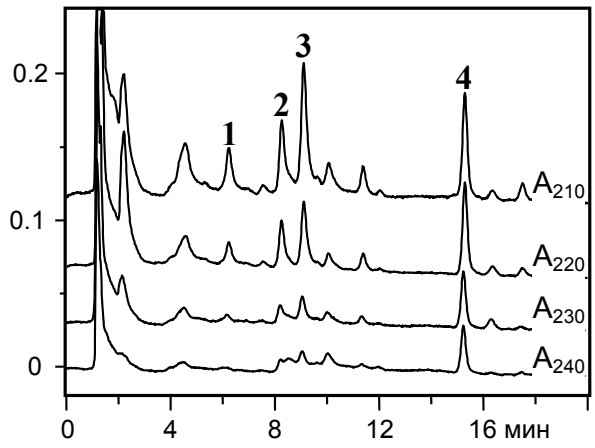


Рис. 14. Хроматограмма сыворотки пациента при комплексной терапии.
Суточная доза: гексамидин – 400 мг, ламиктал – 50 мг, карбамазепин – 600 мг.

Условия разделения как на рис. 11. *t*=55ºС. Проба: 5 мкл обработанной сыворотки крови.
1– гексамидин (14,7±0,7 мкг/мл);
2– фенобарбитал (21±1 мкг/мл);
3– ламиктал (1,8±0,2 мкг/мл);
4– карбамазепин (8,0±0,4 мкг/мл).

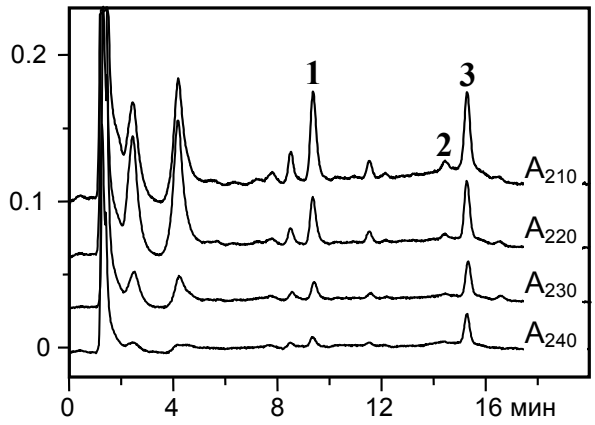


Рис. 15. Хроматограмма сыворотки пациента при комплексной терапии.
Суточная доза: фенобарбитал – 100 мг, дифенин – 100 мг, карбамазепин – 1 г.

Условия разделения как на рис. 11. *t*=55ºС. Проба: 5 мкл обработанной сыворотки крови.
1– фенобарбитал (19±1 мкг/мл);
2– дифенин (1,9±0,2 мкг/мл);
3– карбамазепин (7,4±0,4 мкг/мл).

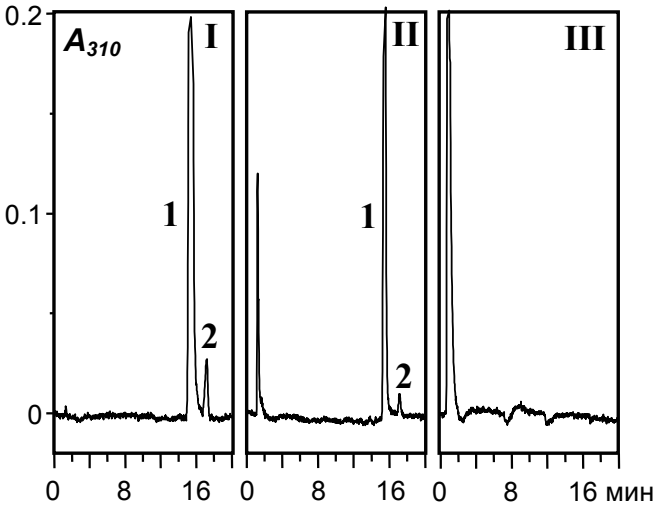


Рис. 16. Определение клоназепама в сыворотке.
I- экстракт стандартного раствора
II- и **III**- экстракты сывороток пациентов, принимающего и не принимающего карбамазепин и клоназепам.

Условия разделения как на рис. 11. λ=310, 320, 330, 340 нм.
Проба: 20 мкл.
1- карбамазепин (6,4±0,4 мкг/мл)
2- клоназепам (25±5 нг/мл).

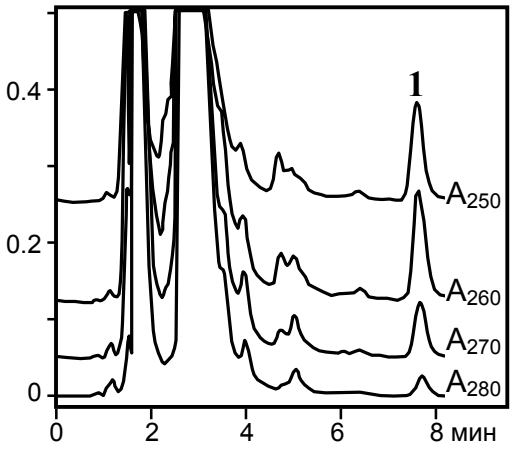


Рис. 17. Определение вальпроевой кислоты (ВК) в экстракте сыворотки в виде *пара*-бромфенацилового эфира (**1**). Концентрация ВК в сыворотке 67±8 мкг/мл.

Колонка: 2 х 75 мм; Nucleosil 100-5 C18. Элюенты: А- 0.2 М $LiClO_4$ - H_3PO_4, pH 3; Б- MeCN. Подвижная фаза: 65% Б. F=150 мкл/мин. t=40°C. λ=250, 260, 270 и 280 нм. Объем пробы: 5 мкл

На рис. 18 приведена зависимость концентрации метотрексата от времени в образцах крови пациента, проходящего лечение по стандартной схеме. Максимальная концентрация метотрексата в процессе инфузии достигает 13 мкМ, а через 6 часов после окончания инфузии составляет 0,1 мкМ (точка "42 час"). Быстрое снижение концентрации МТХ в образцах крови после окончания инфузии свидетельствует о нормальной скорости его выведения из организма. Тем, не менее, концентрация 0,1 мкМ высока и пациенту был введен лейковорин (антидот МТХ). При следующей инфузии доза МТХ была снижена на 10%, т.к. ранее было отмечено, что при снижении дозы на 10 % концентрация МТХ в крови в процессе инфузии снижается в 3-5 раз. Концентрация МТХ в образцах крови данного пациента в процессе инфузии не превышала 4 мкМ, а через 6 часов после окончания инфузии составила 0,02 мкМ.

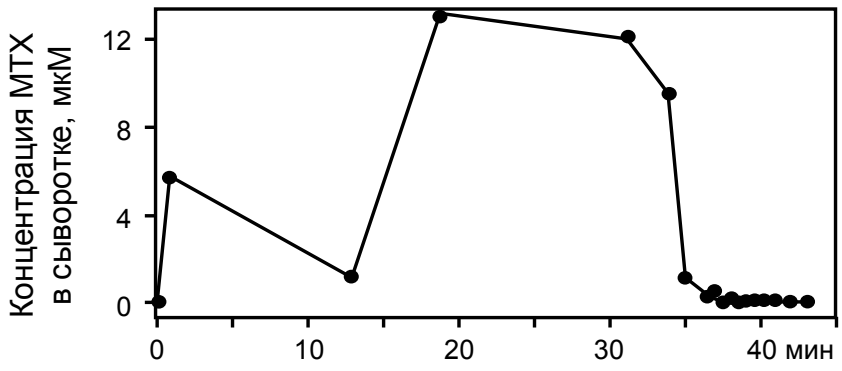


Рис. 18. Изменение концентрации МТХ в сыворотке крови пациента в процессе лечения высокими дозами МТХ.

По разработанной методике был проведен мониторинг 30 пациентов онко-гематологического отделения Областной Государственной детской клинической больницы г. Иркутска, проходящих лечение высокими дозами МТХ (рис. 19).

Отмечено, что около 75% пациентов нуждаются в изменении "стандартной" схемы лечения.

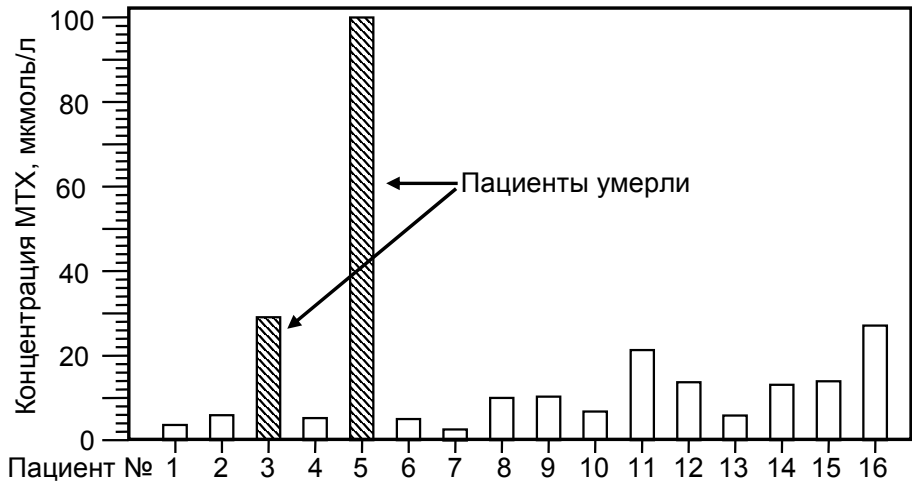


Рис. 19. Максимальная найденная концентрация метотрексата в крови пациентов в процессе инфузии при дозе МТХ 1000 мг/м^2.

Разработанные методики для мониторинга противосудорожных препаратов были использованы для определения их в сыворотке крови более 700 пациентов, проходящих лечение в Иркутской Государственной Областной детской клинической больнице. Результаты исследований использованы для выбора и коррекции доз лекарственных препаратов в процессе курсового лечения, выбора временных интервалов приема препарата. По данным мониторинга за 1997-2003 гг. около 25% пациентов, проходящих лечение в Областной Государственной детской клинической больнице г. Иркутска с диагнозом "эпилепсия" требуют изменения "стандартных" доз лекарственных препаратов.

ВЫВОДЫ.

1. Разработана и оптимизирована унифицированная ВЭЖХ-методика для определения концентрации этосуксимида, гексамидина, фенобарбитала, бензонала, ламиктала, дифенина, карбамазепина, клоназепама, депакина, метотрексата и циклоспорина А в сыворотке крови. Ее основными особенностями являются:

- колонка: ∅ 2x75 мм с сорбентом Nucleosil 100-5 C18;
- элюенты: 0,2 М перхлорат лития (pH 3, H_3PO_4) и ацетонитрил;
- многоволновое фотометрирование в УФ области спектра;
- продолжительность анализа: 10-15 мин.

Методика позволяет осуществлять лекарственный терапевтический мониторинг противосудорожных препаратов при проведении как моно-, так и комплексной терапии.

2. Разработана методика подготовки проб сыворотки крови для лекарственного терапевтического мониторинга этосуксимида, гексамидина, фенобарбитала, бензонала, ламиктала, дифенина, карбамазепина и метотрексата путем их прямого определения с помощью ВЭЖХ. Методика включает в себя 2 стадии: удаление свободных липидов экстракцией гексаном и осаждение белков добавлением 0,6 М раствора перхлората лития в ацетонитриле (pH 2). Методика подготовки пробы требует не более 50 мкл сыворотки, и позволяет выполнить на одной колонке не менее 400 анализов.

3. Практическая применимость разработанных методик ВЭЖХ-анализа и подготовки проб сыворотки крови для лекарственного терапевтического мониторинга показана на примере мониторинга концентрации противо-судорожных препаратов более чем у 700 больных и на примере мониторинга концентрации метотрексата при химиотерапевтическом лечении 30 пациентов.

4. Метрологические характеристики разработанных методик анализа удовлетворяют требованиям, принятым для биоаналитических методов. Относительное стандартное отклонение не превышает 15% в интервале терапевтических концентраций для всех соединений.

Список публикаций.

1. Федорова Г.А., Барам Г.И., Грачев М.А., Толмачева О.П., Александров И.А., Стародубцев А.В. Определение лекарственных препаратов в крови методом ВЭЖХ с многоволновым детектированием. // Тезисы Всеросийского симпозиума по теории и практике хроматографии и электрофореза. Москва. 1998. 13-17 апреля. С.93.
2. Барам Г.И., Федорова Г.А., Грачев М.А., Толмачева О.П., Александров И.А., Стародубцев А.В.Определение лекарственных препаратов в крови методом ВЭЖХ. // Материалы V Национального съезда фармацевтов Украины "Достижения современной фармацевтики и перспективы его развития в новом тысячелетии". Харьков. 1999. С.477.
3. Кожанова Л.А., Барам Г.И., Федорова Г.А. Определение водо- и жирорастворимых витаминов в премиксах методом ВЭЖХ. // Тезисы Всероссийской конференции "Химический анализ веществ и материалов". Москва. 16-21 апреля 2000 г. С.70.
4. Федорова Г.А., Грачев М.А., Барам Г.И., Толмачева О.П., Урсуленко Е.В., Горбачева С.В., Кузьмина Л.А.Применение метода микроколоночной ВЭЖХ для исследования фармакокинетики метотрексата в режиме мониторинга индивидуальных пациентов. // Тезисы VI Конференции "Аналитика Сибири и Дальнего Востока". Новосибирск. 21-24 ноября 2000. С.390.
5. Fedorova G.A., Baram G.I., Grachev M.A., Aleksandrov Yu.A., Tyuleneva G.N., Starodubtsev A.V. Application of Micro-Column HPLC to the Determination of Phenobarbital and Carbamazepine in Human Blood Serum. // Chromatographia. 2001. V.53. No.9-10. P.495-497.
6. Стародубцев А.В., Федорова Г.А., Лаврик С.Ю., Рубцова Е.А. Применение методов микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии и компьютерной электроэнцефалографии для контроля эффективности лечения больных эпилепсией. // Тезизы VIII Всеросийского съезда неврологов.Казань. 23-24 мая 2001 г. С.408.
7. Кожанова Л.А., Федорова Г.А., Барам Г.И. Определение водо- и жирорастворимых витаминов в поливитаминных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Ж. аналит. химии. 2002. Т.57. № 1. С. 49-54.
8. Стародубцев А.В., Федорова Г.А. Применение методов микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии, компьютерной электроэнцефалографии и психофизиологического исследования для контроля эффективности лечения больных эпилепсией. // Тезисы II Объединенной научной сессии СО РАН и СО РАМН. Новосибирск. 18-19 июня 2002 г. С.112.
9. Федорова Г.А., Барам Г.И., Стародубцев А.В., Александров Ю.А., Тюленева Г.И. Определение противосудорожных препаратов в сыворотке крови методом ВЭЖХ. // Тезисы II Объединенной научной сессии СО РАН и СО РАМН. Новосибирск. 18-19 июня 2002 г. С.85.

10. Стародубцев А.В. Федорова Г.А., Рубцова Е.А. Мониторинг функций мозга в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией при лечении карбамазепинов и вальпроатами больных эпилепсией. // Тезисы X Российского национального конгресса "Человек и лекарство". Москва. 7-11 апреля 2003, г. С.361.

11. Федорова Г.А., Барам Г.И. Применение микроколоночной ВЭЖХ в терапевтическом лекарственном мониторинге. // Тезисы 3 Международного симпозиума "Применение хроматографии в бионауках". Москва. 13-18 мая 2003 г. С.143.

Подписано к печати 21.12.2003 г.
Объем 2.5 п.л. Тираж 120 экз. Заказ №
Издательство Института географии СО РАН
664033, г.Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1