

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

ФЕДОРОВА ГАЛИНА АФАНАСЬЕВНА

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

05.11.11 – хроматография и хроматографические приборы

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Г.И.Барам

Научный консультант:
кандидат медицинских наук
А.В.Стародубцев

Иркутск-2003

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
2.1. Введение.....	8
2.2. Неподвижные фазы.....	12
2.3. Хроматографические колонки.....	15
2.4. Подвижные фазы.....	17
2.5. Детектирование лекарственных веществ в ОФ ВЭЖХ.....	23
2.6. Подготовка пробы.....	28
2.7. Валидация биоаналитических методов.....	34
2.8. Заключение.....	36
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
3.1. Оборудование.....	38
3.2. Материалы.....	38
3.3. Методы	
3.3.1. Условия хроматографического определения ЛВ.....	38
3.3.2. Отбор и хранение проб крови.....	39
3.3.3. Удаление липидов из сыворотки крови.....	40
3.3.4. Удаление белков из сыворотки крови.....	40
3.3.5. Подготовка пробы сыворотки крови для определения гексамидина, фенобарбитала, бензонала, ламиктала, дифенина, карбамазепина и метотрексата.....	40
3.3.6. Подготовка пробы для определения этосуксимида.....	40
3.3.7. Подготовка пробы для определения вальпроевой кислоты.....	41
3.3.8. Подготовка пробы для определения клоназепам.....	41
3.3.9. Подготовка пробы для определения циклоспорина А.....	42
3.3.10. Оценка степени извлечения из сыворотки крови клоназепам и циклоспорина А.....	42
3.3.11. Определение градуировочных зависимостей для ЛВ.....	42
3.3.12. Оценка селективности и специфичности методик анализа.....	43
3.3.13. Оценка метрологических характеристик методик анализа.....	43
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
4.1. Выбор масштаба ВЭЖХ.....	44
4.2. Выбор неподвижной фазы.....	44
4.3. Выбор подвижной фазы.....	48
4.4. Выбор условий хроматографического определения	
4.4.1. Выбор длин волн детектирования.....	50

4.4.2. Элюенты и режим элюирования.....	53
4.4.3. Выбор температуры колонки.....	58
4.5. Подготовка пробы	
4.5.1. Удаление липидов.....	60
4.5.2. Осаждение белков.....	64
4.5.3. Подготовка пробы для определения этосуксимида.....	64
4.5.4. Подготовка пробы для определения клоназепама.....	66
4.5.5. Подготовка пробы для определения циклоспорина А.....	66
4.5.6. Подготовка пробы для определения вальпроевой кислоты.....	67
4.6. Определение ПСП в сыворотке крови.....	68
4.7. Определение циклоспорина А в сыворотке крови.....	76
4.8. Определение метотрексата в сыворотке крови.....	77
4.9. Метрологические характеристики разработанных методик	
4.9.1. Предел обнаружения, предел количественного определения и линейный диапазон.....	81
4.9.2. Оценивание характеристики воспроизводимости.....	84
4.9.3. Оценивание правильности.....	84
5. ВЫВОДЫ.....	87
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	99
<i>Приложение 1.</i> Структурные формулы ЛВ, подлежащих мониторингу в РФ.....	100
<i>Приложение 2.</i> Структурные формулы ЛВ, рекомендованных для мониторинга в США.....	104
<i>Приложение 3.</i> Гексамидин, Вальпроевая кислота, Дифенин, Карбамазепин, Клоназепам, Ламиктал, Фенобарбитал, Этосуксимид, Метотрексат, Циклоспорин А.....	106
<i>Приложение 4.</i> Результаты определения противосудорожных препаратов в сыворотке крови пациентов	
Депакин (вальпроевая кислота).....	116
Карбамазепин.....	123
Фенобарбитал и бензонал.....	129
Комплексная терапия.....	134

1. ВВЕДЕНИЕ

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, требуют высокой квалификации персонала и, наконец, существенно повышают 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.

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

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

Научная новизна работы представленной 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 были представлены и обсуждены 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" (Киев, 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).

По теме диссертации опубликовано 11 работ.

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 рисунок, 12 таблиц и 4 приложения. В списке цитируемой литературы 127 наименований.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ В ТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЛЕКАРСТВЕННОМ МОНИТОРИНГЕ

2.1. Введение.

Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) как самостоятельное направление в фармакокинетическом анализе сформировался около 20 лет назад. Он представляет собой контроль концентрации лекарственного вещества 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 фармако-кинетических параметров у разных пациентов.

В Российской Федерации список лекарственных веществ (ЛВ), подлежащих мониторингу, регламентируется Приказом № 64 Министерства здравоохранения РФ от 21 февраля 2000 г.; он содержит около 50 наименований и приведен в табл. 1 [1]. Структурные формулы ЛВ приведены в *Приложении 1*. Отметим, что Приказ носит весьма декларативный характер – в нем не только не указываются методы анализа для перечисленных лекарственных препаратов, но и не приведены значения их терапевтических и токсических концентраций. Эти данные, суммированные в табл. 1 и 2, взяты нами из обзора [2]. Так как они являются лишь ориентировочными и должны рассматриваться в контексте с клиническими показателями для каждого конкретного пациента, то это вносит некоторую неоднозначность в определение терапевтических и токсических концентраций.

К настоящему времени в зарубежных странах не существует общепринятых правил о проведении ТЛМ. В США документы носят рекомендательный характер, как, например, рабочий список ЛВ, обладающих узким терапевтическим диапазоном (NTR-drugs, NTI-drugs), подготовленный рабочей группой Center for Drug Evaluation and Research of US FDA в ноябре 1995 г. (таблица 2, *Приложение 2*), который пересматривается один раз в несколько лет. Структурные формулы и молекулярные массы ЛВ из этого списка приведены в *Приложении 2*.

Таблица 1. Список лекарственных веществ, подлежащих мониторингу в РФ.

Название ЛВ [1] (МНН ¹)	Терапевтическая концентрация ² , мкг/мл [2]	Токсическая концентрация ³ , мкг/мл [2]
Определение в крови:		
Дигитоксин	0,01-0,025	0,03
Дигоксин	0,0005-0,002	0,0025-0,003
Дизопирамид (<i>Ритмилен</i>)	2-8	8
Лидокаин	1-6	6
Мексилетин (<i>Мекситил</i>)	(0,5) 0,7-2	1,5*
Хинидин	1-5	5
Теофиллин	8-20	>20
Амитриптилин	0,05-0,2	0,5
Галоперидол	0,005-0,02	0,05
Диазепам (<i>Седуксен</i>)	0,2-2 (2,5)	1,5*
Имипрамин (<i>Имизин</i>)	0,05-0,15	1
Клоназепам	0,01-0,08	0,1
Препараты лития	0,5-1,3 мМоль	1,5-2 мМоль
Оксазепам (<i>Тазепам</i>)	0,2-1,5	2
Сиднокарб**		
Хлордiazепоксид (<i>Элениум</i>)	0,4-2	3
Хлорпромазин (<i>Аминазин</i>)	0,03-0,15 (0,5)	0,5
Карбамазепин (<i>Тегретол</i>)	2-12	10
Фенитоин (<i>Дифенин</i>)	5-20	20
Фенобарбитал	10-40 (50)	30*
Этосуксимид	30-100	100
Вальпроат натрия	40-100	120-150
Ацетаминофен (<i>Парацетамол</i>)	2,5-25	30
Индометацин	0,3-3	5
Амикацин	10-25	30
Амфотерицин	0,2-3	5-10
Гентамицин	2 (4)-10	12
Ванкомицин	5-40	(10) 40-100
Циклоспорин	0,1-0,4	0,4
Метотрексат***	0,23	0,45

Таблица 1. (продолжение)

Название ЛВ [1] (МНН ¹⁾)	Терапевтическая концентрация ²⁾ , мкг/мл [2]	Токсическая концентрация ³⁾ , мкг/мл [2]
Определение в моче ^{**} :		
Бензодиазепины (метаболиты)		
Производные барбитуровой кислоты: <ul style="list-style-type: none"> • Аллобарбитал • Амобарбитал • Барбитал • Пентобарбитал • Фенобарбитал • Бензонал • Циклобарбитал 		
Морфин (метаболиты)		

¹⁾ Международное непатентованное название.

²⁾ Концентрация лекарственного вещества в крови (сыворотке или плазме) человека, при которой лекарственное вещество оказывает эффективное клиническое действие без значительных побочных эффектов.

³⁾ Концентрация лекарственного вещества в крови (в сыворотке или плазме) человека, при которой появляются значительные токсические симптомы.

^{*} Минимальная зарегистрированная концентрация, при которой отмечены токсические симптомы.

^{**)} Показатели в литературе нами не найдены.

^{***)} Показатели приведены для высокодозной терапии (48 час).

Поиск литературы, проведенный по ключевой фразе "therapeutic drug monitoring" за период 1995-2003 г.г. показал, что список ЛВ, при применении которых рекомендуется использовать ТЛМ, значительно шире приведенных в таблицах 1 и 2 и включает в себя более 100 названий, при этом их число постоянно увеличивается в связи с появлением новых лекарственных веществ.

Определение концентрации ЛВ можно осуществлять в различных биологических жидкостях (кровь, слюна, моча, ликвор), но терапевтический эффект лучше всего коррелирует с концентрацией вещества в крови, поэтому кровь является наиболее распространенным объектом исследования.

Таблица 2. Список лекарственных веществ, рекомендованных для мониторинга (определение в крови) в США.

Название ЛВ (МНН ¹⁾)	Терапевтическая концентрация ²⁾ , мкг/мл [2]	Токсическая концентрация ³⁾ , мкг/мл [2]
Aminophylline (<i>Эуфиллин</i>)		
Carbamazepine (<i>Карбамазепин</i>)	2-12	10*
Clindamycin hydrochloride**		
Clonidine hydrochloride	0,0003-0,0015	0,025
Duphylline (<i>Теофиллин</i>)	8-20	25-30
Disopyramide phosphate	2-8	8
Etinil Estradiol/Progestin**		
Guanetidine sulphate (<i>Октадин</i>)	0,01	-
Isoetharine Mesylate**		
Isoproterenol sulphate** (<i>Изадрин</i>)		
Lithium Carbonate	0,5-1,3 ммоль	1,5-2 ммоль
Metaproterenol sulphate** (<i>Орципреналина сульфат</i>)		
Minoxidil**		
Oxtriphylline (<i>Холина теофиллинат</i>)	8-20	25-30
Phenytoin (<i>Дифенин</i>)	8-20	20-30
Prazosin hydrochloride	0,001-0,03	0,9
Primidone (<i>Гексамидин</i>)	5-12	15
Procainamide hydrochloride (<i>Новокаинамид</i>)	2,5-10	8*
Quinidine	1-5	5
Theophylline	8-20	25-30
Valproic Acid	40-100	120-150
Divalproex sodium (<i>Депакин</i>)	40-100	120-150
Warfarin	1-7	10

¹⁻³⁾ Как в Таблице 1.

*) Минимальная зарегистрированная концентрация, при которой отмечены токсические симптомы.

***) Показатели нами в литературе не найдены.

Для определения концентрации ЛВ в крови используются различные методы аналитической химии: газовая и жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез, иммунологические тесты. Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки.

ВЭЖХ - важнейший метод для осуществления ТЛМ. Он является высокоспецифичным, универсальным, быстрым, чувствительным, дает

возможность одновременно определять несколько веществ, отличается достаточной точностью и воспроизводимостью, легко автоматизируем. Несмотря на существование большого разнообразия вариантов ВЭЖХ, к настоящему времени многие из них потеряли свое значение и обычно для определения ЛВ используется метод обращенно-фазной ВЭЖХ. Литература за 1995-2003 гг. свидетельствует о том, что для подавляющего числа ЛВ в рутинном клиническом анализе ВЭЖХ применяется в следующем виде:

Колонка: \varnothing 4,0 - 4,6 x 150 - 250 мм.

Неподвижная фаза: обращенная фаза типа C18.

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода (рН 3).

Температура: комнатная.

Давление: 50 - 150 атм.

Детектор: УФ-фотометр.

Далее мы последовательно рассмотрим каждый из этих параметров.

2.2. неподвижные фазы.

Большинство задач по ГЛМ решается с применением колонок с обращенными фазами (ОФ) на основе объемно-пористого силикагеля. Другие типы сорбентов используются очень редко, причем довольно часто они могут быть заменены теми же обращенными фазами. Применение ОФ вполне оправдано, так как большинство лекарственных веществ - умеренно полярные, достаточно хорошо растворимые в воде соединения.

Наиболее популярной обращенной фазой для определения лекарственных соединений в настоящее время является фаза C18, которая представляет собой силикагель с привитыми линейными радикалами $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CH}_2-$. На этой фазе выполняется 80-85% разделений. Около 10% разделений выполняется на фазе C8 с привитым радикалом $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-$.

Коммерчески доступные ОФ обладают сходными характеристиками. Как правило, это сорбенты с "мономерным" типом прививки алкильного радикала, зернами сферической формы с диаметром 3-10 мкм, размером пор 8-12 нм,

содержанием углерода 12-20% и прошедшие процедуру дезактивирования поверхности ("эндкеппинг").

Размер пор применяемых в ТЛМ сорбентов обусловлен размерами молекул анализируемых веществ, молекулярная масса которых в большинстве случаев не превышает 500. От пористости силикагеля зависит его площадь поверхности. Для типичного объемно-пористого силикагеля, имеющего размер пор 8-12 нм, она составляет 180-320 м² на 1 г силикагеля. Площадь поверхности силикагеля, в свою очередь, определяет количество силанольных групп, к которым присоединяются алкильные радикалы в процессе синтеза ОФ.

Содержание углерода. Эта величина прямо или косвенно связана с площадью поверхности и плотностью прививки радикалов. Для используемых в ТЛМ сорбентов она обычно составляет 12-20% от веса сорбента. При таком содержании углерода достигаются приемлемые значения коэффициентов емкости для большинства ЛВ. Сорбенты с более низким содержанием углерода обладают более низкой емкостью и не обеспечивают достаточного удерживания гидрофильных соединений. Сорбенты с очень высоким содержанием углерода (25-30%) проявляют склонность к "коллапсу" в подвижных фазах с большим содержанием воды и также непригодны для определения гидрофильных веществ [3, 4]. Коллапс обращенной фазы – явление, связанное со "слипанием" радикалов С18 между собой, которое приводит к резкому уменьшению гидрофобной поверхности и перекрыванию пор матрицы.

Эндкеппинг. При синтезе обращенных фаз типа С18 обычными методами из-за стерических препятствий не удается, как правило, добиться полной модификации поверхности силикагеля и около 50% силанольных групп остаются свободными. Их взаимодействие с веществами основного характера приводит ко многим нежелательным эффектам - искажению формы пика, невозпроизводимости времен удерживания, неполному элюированию компонентов пробы.

Проблема остаточных силанольных групп обычно решается с помощью процедуры дезактивирования поверхности ОФ сорбента ("эндкеппинг"), которая заключается в дополнительной обработке уже модифицированного силикагеля низкомолекулярными алкилхлорсиланами. Большинство современных ОФ

"эндкеппированы". Некоторые сорбенты, выпускаемые фирмами в двух вариантах - с полным и частичным эндкеппингом - заметно различаются между собой по селективности.

За последние несколько лет появились целые классы ОФ, где дезактивирование поверхности силикагеля решается другими, более сложными, способами [5-9]. К таким сорбентам относятся сорбенты с полимерной защитой поверхности (polymer encapsulation) [5]; с горизонтальной полимеризацией [6]; с "включенными" полярными группами (embedded polar groups) [7, 8]; бидентатные ОФ [9] и пр. Необходимо отметить, что эти сорбенты существенно дороже "традиционных", а их "уникальные" свойства фирмы-производители часто слишком преувеличивают.

Селективность ОФ. Хроматографические свойства (селективность) номинально идентичных ОФ нередко существенно различаются. Причиной этого могут быть разная плотность прививки радикалов, концентрация и тип остаточных силанольных групп, примеси металлов и некоторые другие факторы [10]. Для характеристики селективности ОФ сорбентов используют спектроскопические и хроматографические методы, достоинства и недостатки каждого из которых подробно обсуждаются в обзоре [11]. На практике для сравнительной оценки селективности сорбентов чаще применяют хроматографирование различных тестовых смесей. Вещества, включаемые в состав тестовой смеси, могут являться аналогами исследуемых соединений [12], но, в более общем случае, тестовый раствор состоит из нескольких веществ, каждое из которых (или их группа) характеризует определенное свойство сорбента. Примеров таких тестовых смесей в сочетании с разными подвижными фазами очень много, но общепринятой процедуры, тем не менее, пока нет.

Хотя сравнение предлагаемых тестов между собой часто показывает, что получаемые результаты весьма неоднозначны [13, 14], тем не менее, их использование позволяет хотя бы качественно сравнивать сорбенты по селективности и разделять их на отдельные группы. Внутри этих групп сорбенты обладают сходными хроматографическими характеристиками и небольшие различия в селективности ОФ можно скорректировать, варьируя условия анализа [15].

2.3. Хроматографические колонки.

Размеры колонок. Хроматографические колонки, используемые в ТЛМ, имеют типичные для ВЭЖХ размеры: их внутренний диаметр составляет 4,0-4,6 мм, а длина составляет 100-250 мм. В последние несколько лет, благодаря появлению более совершенного хроматографического оборудования, чаще стали применять колонки длиной 100-150 мм и в настоящее время на таких колонках выполняется около 50% разделений. Применение коротких колонок - один из важных путей снижения стоимости анализа, позволяющий сократить длительность анализа и уменьшить расход растворителей [16-18].

Еще больше уменьшить стоимость анализа можно переходом к полумикро- или к микроколонкам (1-2 x 100-250 мм), но такие колонки требуют специального хроматографического оборудования, которое само по себе весьма дорого. Видимо, по этой причине микро-ВЭЖХ в ТЛМ используется редко.

Размеры колонок определяют многие важные характеристики любой хроматографической методики и ниже мы рассмотрим это подробнее.

Эффективность колонки. Современные методы упаковки позволяют получать колонки, для которых высота приведенной теоретической тарелки (т.т.) составляет 2-3 диаметра зерна сорбента:

$$\bar{N} = H/d_p,$$

где \bar{N} - высота приведенной теоретической тарелки; H - высота эквивалентная теоретической тарелке; d_p - диаметр зерна сорбента. Эффективность колонок, упакованных фазами с диаметром частиц 5 мкм может достигать 100000 т.т./м, но, на практике составляет обычно не более 70000-80000 т.т./м.

Литература по ТЛМ свидетельствует, что большинство задач решается на колонках длиной 250 мм, которые должны иметь эффективность 15000-20000 т.т. Однако, реальная эффективность этих колонок, найденная из приводимых хроматограмм, часто не превышает всего 3000-5000 т.т. Причины такого несоответствия связаны, по всей вероятности, с неоптимальным составом подвижной фазы, значительным внеколоночным уширением зон, перегрузкой

колонки, большим объемом пробы и пр. Если принять, что 5000 т.т. является достаточной эффективностью колонки, то очевидно, что оптимизация анализа, направленная на достижение максимальной эффективности колонки, должна позволить уменьшить ее длину до 50-100 мм. Это, в свою очередь, даст возможность значительно уменьшить объем подвижной фазы, требуемой для выполнения одного разделения [17].

Нагрузка на колонку. Известно, что для обеспечения максимальной эффективности колонки нагрузка на типичный ОФ сорбент не должна превышать 1-10 мкг вещества-аналита на 1 г сорбента [19]. Отсюда следует, что для "стандартной" колонки $\varnothing 4,6 \times 250$ мм максимальное количество вещества в пробе не должно быть более 4-40 мкг. В ТЛМ на практике количество самого вещества-аналита в пробе не превышает обычно 10-100 нг, но из-за высокого содержания сильно удерживаемых балластных веществ суммарная нагрузка может превышать 100 мкг на колонку. Для того, чтобы избежать перегрузки колонки и, как следствие, уменьшения ее эффективности, надо или применять более высокочувствительные детекторы, или специально освобождаться от балластных веществ на стадии подготовки образца.

При уменьшении диаметра колонки следует помнить, что нагрузка должна быть снижена пропорционально изменению ее объема.

Скорость потока подвижной фазы. Многими исследованиями показано, что в ВЭЖХ для достижения максимальной эффективности колонки, упакованной сорбентом с диаметром частиц 5 мкм, линейная скорость потока должна быть равной примерно 1 мм/сек [20]. Соответствующая ей объемная скорость потока для колонки с внутренним диаметром 4,6 мм составит примерно 1 мл/мин. Ускорение анализа за счет увеличения скорости потока неизбежно приводит к уменьшению эффективности колонки.

Давление на входе в колонку. Давление в хроматографической колонке само по себе не влияет на ее эффективность. Величина давления определяется скоростью потока и вязкостью элюента, длиной и диаметром колонки, а также размером зерна сорбента и описывается эмпирическим уравнением [21]:

$$P \approx 21 \frac{F \cdot L \cdot \eta}{d_p^2 \cdot \varnothing^2},$$

где P - давление на входе в колонку, МПа; F - скорость потока, мл/мин; L - длина колонки, мм; η - вязкость подвижной фазы, спз; d_p - диаметр частиц сорбента, мкм; \varnothing - диаметр колонки, мм.

Очевидно, что чем большее давление может развивать насос хроматографа, тем большую скорость потока можно достичь и тем быстрее можно выполнить разделение. С другой стороны, чем выше давление, при котором осуществляется разделение, тем быстрее изнашивается дорогостоящее хроматографическое оборудование. Хотя современные хроматографы позволяют работать при давлениях 40-50 МПа, однако рабочее давление редко превышает 15 МПа.

Отметим также, что конструкция типичных для ВЭЖХ насосов плунжерного типа из-за больших пульсаций потока обычно не дает возможности работать при давлениях ниже 5 МПа без применения специальных демпферов. Это обстоятельство мешает применять короткие колонки с низким гидродинамическим сопротивлением. Для работы с такими колонками целесообразно применять неппульсирующие насосы шприцевого типа.

2.4. Подвижные фазы.

Состав подвижных фаз (ПФ) является в ВЭЖХ важнейшим фактором, определяющим селективность колонки. Варьируя состав ПФ путем изменения типа органического растворителя, его концентрации, рН, вводя нейтральные соли, хиральные или ион-парные агенты, изменяя температуру, можно регулировать селективность по отношению к определяемым компонентам в весьма широких пределах. Рассмотрим влияние каждого из этих параметров на селективность колонки с типичной обращенной фазой (ОФ).

Органические растворители. В ОФ ВЭЖХ обычно применяются бинарные ПФ, состоящие из воды и органического растворителя. Органический растворитель играет роль конкурента по отношению к определяемому веществу, то есть

вытесняет его из колонки. К органическим растворителям, используемым в ОФ ЖХ, предъявляют следующие требования:

- смешиваемость его с водой во всем используемом интервале концентраций;
- низкая вязкость элюента для обеспечения малого гидродинамического сопротивления колонки;
- химическая инертность его по отношению к определяемым веществам.

Кроме того, растворитель не должен мешать детектированию. Так, при использовании УФ-детектора он должен быть "прозрачен" в соответствующей области спектра.

Всем этим требованиям в различной степени удовлетворяют несколько растворителей - метанол, ацетонитрил, этанол, изопропанол, *n*-пропанол, тетрагидрофуран и диоксан. Каждый из них обладает своей элюирующей силой, которая в вышеприведенном ряду повышается.

На практике в ВЭЖХ чаще всего используется ацетонитрил (более 95% случаев). Он "прозрачен" в области УФ спектра от 190 нм и обладает самой низкой вязкостью. Другие растворители используются реже, но иногда их применение необходимо для достижения требуемой селективности. В отдельных работах для улучшения разделения используются трех- или четырехкомпонентные смеси:

- вода/ацетонитрил/метанол [22];
- вода/ацетонитрил/ТГФ [23];
- вода/ацетонитрил/метанол/2-пропанол [24].

Параметром, влияющим на удерживание вещества, является концентрация органического растворителя в ПФ. Для разделения простых смесей ее подбирают эмпирически, в более сложных случаях оптимизацию состава можно проводить на основе анализа зависимостей, связывающих удерживание соединений с концентрацией органического растворителя в ПФ [24-26].

Величина рН подвижной фазы. Интервал значений рН подвижной фазы при работе с ОФ сорбентами на основе силикагеля обычно ограничен интервалом стабильности силикагеля (рН 2-8), хотя некоторые современные сорбенты устойчивы до рН 10-11 [5, 6, 9]. За пределами этих интервалов время эксплуатации хроматографической колонки существенно сокращается.

Определение ЛВ в ТЛМ выполняется чаще при кислых или слабокислых значениях рН подвижной фазы и реже – в нейтральных или слабощелочных ПФ. Элюенты, состоящие только из органического растворителя и воды практически не используются даже при определении нейтральных соединений, так как сама матрица содержит большое количество ионогенных веществ и в "безбуферной" ПФ получить воспроизводимые результаты разделения трудно.

Наиболее часто при ОФ ВЭЖХ ЛВ используется подвижная фаза с $pH \approx 3$. Это связано со следующими причинами:

- диссоциация остаточных силанольных групп ОФ сорбента при этом значении рН подавлена (pK_a силанольных групп находится в интервале 3,5 - 4,0) и их взаимодействие с веществами основного характера минимизировано;
- большинство органических кислот при $pH \approx 3$ находятся в молекулярной форме (обычно их $pK_a > 4$) и удерживаются на обращенной фазе лучше по сравнению с их анионами;
- при $pH \approx 3$ ОФ стабильна в течение длительного времени.

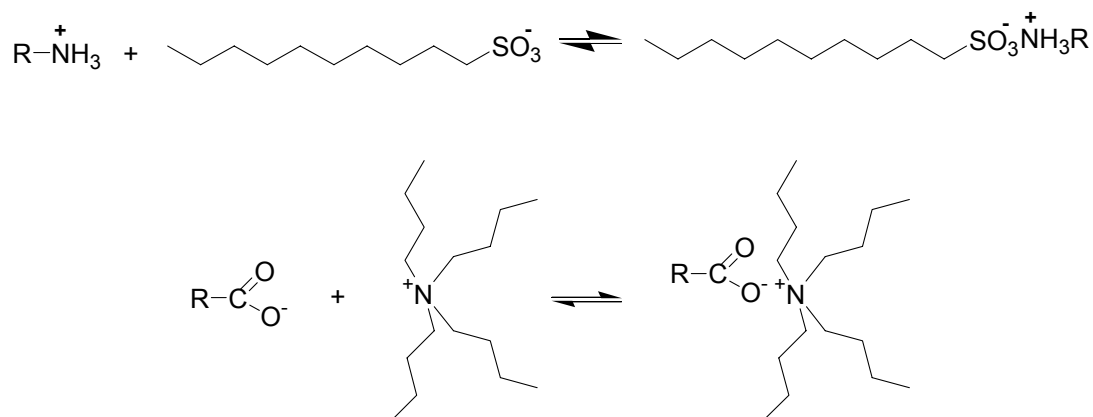
Для поддержания заданных значений рН используется буферная система, выбор которой зависит от требуемого значения рН. Для обеспечения достаточной буферной емкости необходимо выполнение условия $pH = pK_a \pm 1$, где K_a - константа диссоциации выбранной кислоты или основания [27, 28]:

Интервал значений рН	Буферная система
2-3	H_3PO_4 , H_2SO_4 , CH_3COOH , $HCOOH$, CF_3COOH
3-5	CH_3COO^-/CH_3COOH $H_2PO_4^-/H_3PO_4$
5-8	HPO_4^{2-}/H_3PO_4 , NH_4HCO_3

Ионная сила ПФ. Концентрация буфера в ПФ обычно составляет 0,01-0,05 М и эта величина определяет ионную силу элюента, если в него не добавлена нейтральная соль. С повышением концентрации органического растворителя ионная сила ПФ уменьшается вследствие подавления диссоциации. Как регулятор селективности, ионная сила ПФ используется по отношению к слабо

удерживающимся гидрофильным соединениям: увеличение удерживания этих веществ связано с высаливающим эффектом. В качестве нейтральных солей для повышения ионной силы ПФ применяют перхлораты натрия и лития, сульфаты натрия или аммония [29-31]. Фосфат калия используется с этой целью очень редко и только в сочетании с ПФ, содержащей низкие концентрации органического растворителя [32]. Удобнее всего применять перхлорат лития, так как он, в отличие от других солей, хорошо растворяется в органических растворителях, не поглощает в УФ-области и не обладает буферной емкостью, т.е. может использоваться для ПФ во всем диапазоне pH.

Ион-парная ВЭЖХ на обращенных фазах. Распространенным приемом для повышения удерживания гидрофильных ионов, слабо удерживающихся на обращенных фазах, является использование режима ион-парной хроматографии. При этом в водно-органическую ПФ вводят гидрофобные ионы (ион-парные агенты) для образования ионных пар по схемам:



Для определения оснований применяют натриевые соли алкилсульфо- или алкилсульфоновых кислот с числом атомов углерода алкильной цепи от 4 до 12. В ТЛМ часто используются 1-гексан-или 1-гептансульфонокислоты [33, 34]. Довольно распространенным ион-парным агентом является додецилсульфат натрия [35].

При определении кислот в качестве ион-парного агента в ПФ вводят соли триалкиламинов или тетраалкиламмония. Обычно это тетрабутиламмоний [36] или реже - тетраметиламмоний [37]. Длина алкильной цепи используемого ион-парного

агента определяет удерживание образующейся ионной пары - с увеличением длины цепи время удерживания увеличивается.

Концентрация ион-парного агента в подвижной фазе составляет обычно 0,001-0,01 М [33-37]. Концентрация буфера в ПФ в режиме ион-парной хроматографии выбирается в интервале 0,005-0,01 М. Она должна быть достаточно низкой, чтобы не мешать образованию ионных пар - повышение ионной силы элюента приводит к нежелательной их диссоциации.

Температура колонки. Температура колонки в процессе разделения играет важную роль в ВЭЖХ. В общем виде зависимость удерживания соединения от температуры колонки для изократической ОФ ВЭЖХ описывается уравнением $\log k' = f(T)$. В узком диапазоне изменения температуры эта зависимость близка к линейной [20]. При градиентном элюировании зависимость удерживания от температуры более сложная [38].

Если функции $k' = f(T)$ для разделяемых соединений заметно различаются, то, изменением температуры можно регулировать селективность. Значительное влияние температуры на селективность отмечено для ионогенных веществ, степень диссоциации которых существенно зависит от температуры [39]. Температура может влиять и на пространственную структуру молекулы, что также сопровождается изменением селективности [40]. Особенно это касается биополимеров.

Из вышесказанного следует, что термостатирование хроматографической колонки является необходимым условием для достижения хорошей воспроизводимости анализа. Если требуется воспроизводимость времени удерживания в пределах 1%, то колебания температуры колонки не должны превышать $\pm 0,35^\circ\text{C}$ [20].

Кроме улучшения воспроизводимости анализа, термостатирование позволяет выполнять разделения при более высокой (по отношению к комнатной) температуре, что ведет к уменьшению вязкости подвижной фазы и, как следствие, к снижению рабочего давления.

Отметим, что на сегодняшний день большинство хроматографических методик в ТЛМ не предусматривают обязательного термостатирования колонки. Определение ЛВ выполняется обычно при комнатной температуре и число работ, в которых использовано термостатирование колонки, невелико.

Режим элюирования. Анализ в ТЛМ предполагает определение, как правило, одного, реже - двух и более соединений. Если определяемые вещества не слишком различаются между собой по удерживанию, обычно удается подобрать такую ПФ, которая позволяет осуществить разделение за приемлемое время в изократическом режиме. Применение изократического элюирования экономически более выгодно. Оно позволяет уменьшить продолжительность анализа и снизить требования к чистоте растворителей, оборудование для изократической ВЭЖХ дешевле.

В случае одновременного определения двух и более сильно различающихся по полярности соединений изократическое элюирование становится нецелесообразным, так как при попытке уменьшить удерживание гидрофобного вещества, слабоудерживаемые соединения перестают удерживаться. В таких случаях используют градиентное элюирование, когда сила элюента (концентрация органического растворителя) в процессе элюции повышается. Форма градиента подбирается в соответствии с желательным временем и степенью разделения веществ. Как правило, это выполняется экспериментально. Для строгой оптимизации формы градиента существуют компьютерные программы, в том числе и коммерчески доступные [41, 42].

Градиентное элюирование является универсальным подходом к разделению веществ, так как оно позволяет полностью удалять из колонки сильноудерживаемые компоненты. Следует отметить, однако, что этот режим требует применения более дорогостоящего оборудования и более чистых растворителей (квалификация "для градиентной ВЭЖХ", "for gradient HPLC").

Кроме этого, анализ с использованием градиентного элюирования более продолжителен, так как необходима регенерация колонки в каждом цикле. И, наконец, градиентное элюирование нежелательно использовать в ион-парной ВЭЖХ, хотя такие работы встречаются [43].

В заключение отметим, что в ТЛМ градиентное элюирование используется редко, вероятно, из экономических соображений.

2.5. Детектирование лекарственных веществ в ОФ ВЭЖХ.

Детектирование является важной составной частью аналитического метода. Выбор детектора – универсальный или селективный, – зависит от конкретной аналитической задачи и определяется многими соображениями. В ВЭЖХ-анализе лекарственных соединений чаще всего применяются 4 типа детектирования – фотометрическое (ФМ), флуоресцентное (ФЛ), электрохимическое (ЭХ) и масс-спектрометрическое (МС).

Фотометрические детекторы. Фотометрические детекторы в ВЭЖХ-анализе ЛВ получили наибольшее распространение, так как практически все эти вещества в растворенном состоянии способны поглощать свет. К достоинствам фотометрических детекторов можно отнести достаточно высокую чувствительность и большой линейный диапазон. Кроме этого, ФМ детекторы являются неразрушающими, что позволяет выделять вещество из элюата в чистом виде и исследовать его дополнительно.

Чаще всего применяются детекторы по поглощению света в ультрафиолетовой области спектра (УФ фотометры и УФ спектрофотометры). Их чувствительность достигает 10^{-8} - 10^{-9} г вещества в пробе. ФМ детекторы можно подразделить на три вида и все они применяются в ТЛМ:

- с фиксированной длиной волны, которая определяется типом лампы и типом светофильтра;
- с перестраиваемой длиной волны;
- с многоканальной регистрацией.

ФМ детектор с фиксированной длиной волны – самый недорогой и простой по конструкции. Среди этого типа наибольшее распространение получили УФ детекторы, источником излучения в которых является ртутная лампа низкого давления с интенсивной полосой излучения 253.7 нм ("254 нм"). К достоинствам таких фотометров можно отнести низкий уровень шумов (2×10^{-5} оптических

единиц), но в последние годы они редко используются в ТЛМ, так как не позволяют детектировать вещества, которые не поглощают (или слабо поглощают) при длине волны 254 нм.

ФМ детектор с перестраиваемой длиной волны (спектрофотометр) является самым распространенным в ТЛМ. Источником излучения в нем служит дейтериевая лампа с непрерывным спектром (190-400 нм) или галогеновая лампа для видимой части спектра (400-800 нм).

Как правило, детектирование в ТЛМ проводят при длине волны, соответствующей максимальному поглощению ($\lambda_{\text{макс}}$). Когда $\lambda_{\text{макс}}$ лежит в области коротких длин волн (200-220 нм), возникают проблемы, связанные с мешающим поглощением веществ матрицы (например, сыворотки крови) и примесей в растворителях. В этих случаях необходима либо более эффективная колонка, позволяющая отделить мешающие вещества, либо более полное отделение мешающих веществ в процессе подготовки пробы. Детектирование в длинноволновой области УФ спектра иногда предпочтительнее, даже несмотря на некоторое снижение чувствительности, так как при этом уменьшается число пиков на хроматограмме за счет исключения пиков непоглощающих в этой области спектра соединений [44].

ФМ детекторы с многоканальной регистрацией. К ФМ детекторам с многоканальной регистрацией относятся диодно-матричные детекторы (ДМД; по-английски - Diode Array Detector или DAD) и многоволновые детекторы.

При применении ДМД фотометрирование элюата выполняется одновременно во всем спектре через короткие промежутки времени. Получаемая спектральная информация повышает достоверность идентификации пиков, позволяет оценивать их гомогенность и выполнять "математическое" разделение неразрешенных пиков [45]. ДМД применяются для создания библиотек спектральных данных, которые получили широкое распространение в токсикологических исследованиях [46, 47]. Несмотря на широкие возможности таких детекторов, они пока мало применяются в рутинной практике ТЛМ вследствие их высокой стоимости.

К другому типу детекторов с многоканальной регистрацией относятся детекторы хроматографов серии "Милихром" (ЗАО "Научприбор" и ЗАО

"ЭкоНова", Россия), детекторы М 490 (Waters, USA), SPD-10А (Shimadzu, Япония). Фотометрирование элюата в этих детекторах осуществляется по циклической программе, при этом детекторы серии "Миличром" позволяют выполнять фотометрирование на многих длинах волн ("Миличром А-02" до 8 длин волн), а детекторы WATERS М 490 и Shimadzu SPD-10А - на двух длинах волн. Количество получаемой спектральной информации при применении таких детекторов меньше, чем в случае ДМД, но значительно больше по сравнению с одноканальными фотометрами. Эти детекторы значительно дешевле ДМД и не требуют мощного математического обеспечения.

Чувствительность фотометрического детектора. Важным преимуществом ФМ детектора является возможность предварительной оценки его чувствительности по отношению к веществу-аналиту, т.е. оценки уровня минимально определяемой концентрации вещества при заданном отношении "сигнал/шум" для данной хроматографической системы. Формула для расчета предела детектирования приведена ниже [16]:

$$C_{\text{мин}} = \frac{2A_{\text{шум}} \cdot V_o (1 + k') \sqrt{2\pi}}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s \cdot \sqrt{N}},$$

где: $C_{\text{мин}}$ - предел детектирования (минимальная детектируемая концентрация) при отношении "сигнал/шум" $=2$; $A_{\text{шум}}$ – уровень шумов детектора; V_o – свободный (мертвый) объем колонки; k' - фактор удерживания вещества; ε - коэффициент экстинкции вещества; l - длина оптического пути измерительной ячейки; V_s - объем образца; N - эффективность хроматографической колонки.

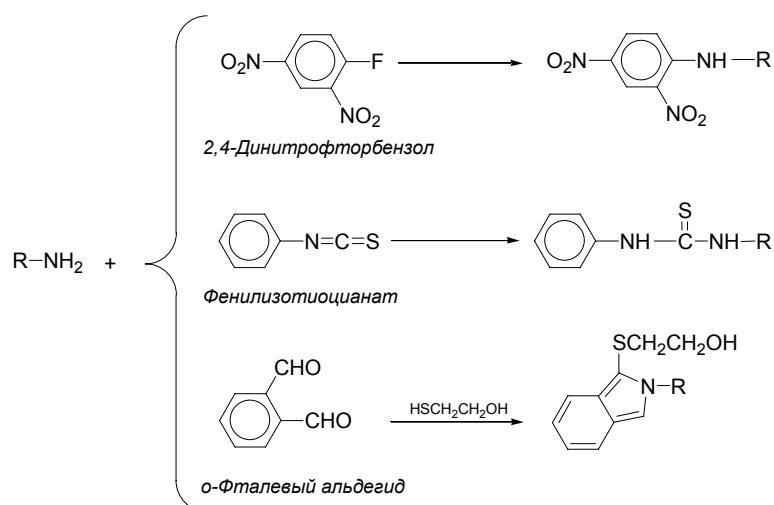
Электрохимический и флуоресцентный детекторы обладают рекордной чувствительностью (до 10^{-10} - 10^{-11} г) и высокой селективностью [48-50], но в ТЛМ они имеют ограниченное применение, так как лишь небольшая часть лекарственных соединений имеет низкие окислительно-восстановительные потенциалы или обладает природной флуоресценцией. Например, только для 30% ЛВ, подлежащих мониторингу в РФ (таблица 1), возможна ЭХ детекция и только два обладают природной флуоресценцией - индометацин и хинидин.

Расширить круг соединений, для определения которых можно применять ЭХ или флуоресцентное детектирование, позволяют фотохимические реакторы. В результате фотохимической реакции при облучении элюата УФ-излучением ($\lambda=254$ нм) многие ЛВ (например, алкалоиды, антибиотики, барбитураты, бензодиазепины, диуретики) превращаются в ЭХ-активные или флуоресцентные производные [51-53]. Сочетание ЭХ детектора с фотохимическим реактором обеспечивает более высокую чувствительность определения ЛВ в плазме крови еще и за счет разрушения части ЭХ-активных эндогенных соединений матрицы [52]. Однако, несмотря на высокие потенциальные возможности фотореактивного детектирования, применяется оно довольно редко из-за своих низких метрологических характеристик.

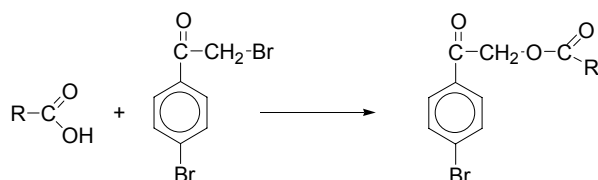
Масс-спектрометрическое детектирование – относительно новый, высокочувствительный и высокоселективный метод анализа. Детекторы-масс-спектрометры с ионизацией при атмосферном давлении, позволяют детектировать соединения на уровне нескольких пикограмм [54]. Возможность применения МС детектора продемонстрирована практически для всех ЛВ. Этот метод достаточно широко известен в токсикологических исследованиях [54-56], но применение МС детектора в рутинном анализе пока экономически невыгодно в связи с высокой стоимостью аппаратуры. Кроме того, конструкция масс-спектрометрического детектора весьма сложна и требует высокой квалификации персонала, что также ведет к повышению стоимости анализа.

Химическая дериватизация. Вещества, которые не поглощают или слабо поглощают в УФ-области спектра, можно детектировать в виде УФ-поглощающих производных (дериватов), получаемых в результате специальных реакций. Условия получения многих таких производных хорошо разработаны и некоторые часто используемые реакции приведены ниже.

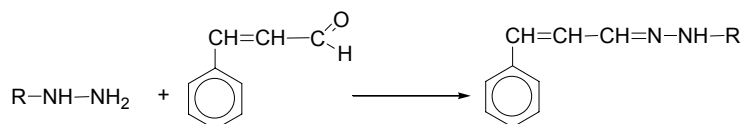
Для получения УФ-поглощающих производных первичных или вторичных аминов применяются такие реагенты, как 2,4-динитрофторбензол или фенилизотиоцианат [57, 58]. Реакция с *орто*-фталевым альдегидом приводит к образованию флуоресцентных производных, которые можно также и фотометрировать в УФ-области спектра [59, 60]:



Органические кислоты удобно определять в виде УФ-поглощающих *пара*-бромфенациловых эфиров [61]:



Вещества, в структуре которых присутствует гидразидная группа, можно определять в виде оснований Шиффа, полученных по реакции [62]:



Непрямое фотометрирование. Для детектирования непоглощающих веществ можно использовать непрямое (косвенное) детектирование [63]. Суть этого метода заключается в применении подвижной фазы, содержащей поглощающее соединение, которое является "хроматографическим конкурентом" для определяемых веществ. В процессе элюирования соединение-конкурент вытесняет вещества-аналиты с сорбента и занимает их места на его поверхности. Т.к. концентрация конкурента в ПФ при этом уменьшается, то на хроматограмме регистрируются "отрицательные" пики оптического поглощения, площадь которых пропорциональна концентрации определяемых веществ.

Этот метод детектирования часто используется в ионной хроматографии для определения непоглощающих органических и неорганических анионов. В ТЛМ прямое фотометрирование практически не используется, по-видимому, из-за мешающего влияния поглощающих свет соединений матрицы.

2.6. Подготовка пробы.

Подготовка пробы в химическом анализе часто является длительной, трудоемкой и, вследствие этого, наиболее дорогостоящей частью аналитического процесса. Ее целью может быть удаление из пробы веществ, мешающих определению, перевод определяемого соединения в форму, удобную для анализа, концентрирование определяемого соединения. Обычно подготовка пробы состоит из нескольких стадий, каждая из которых требует определенного времени и является дополнительным источником погрешности.

Рассмотрим существующие методы подготовки пробы в ТЛМ.

Традиционным объектом исследования в ТЛМ служит плазма или сыворотка крови, которая отличается от плазмы отсутствием фибрина. Большая часть лекарственных веществ не связывается с фибрином, поэтому подготовка проб плазмы и сыворотки и результаты хроматографического анализа в таких случаях идентичны. В дальнейшем все, что будет сказано о сыворотке крови, можно относить и к плазме.

Сыворотка крови содержит белки (70-80 мг/мл), минеральные соли (около 7,5 мг/мл), липиды (4-8 мг/мл). Кроме этого, в ней содержится большое количество низкомолекулярных органических веществ, которые потенциально могут мешать проведению анализа: гормоны, биогенные амины, витамины, креатин, креатинин, билирубин, мочевая кислота и др.

Показано, что при прямом введении сыворотки крови в колонку с ОФ присутствующие в ней белки, липиды и некоторые другие компоненты вызывают заметное уменьшение эффективности колонки, а осаждение этих веществ на поверхности сорбента и на фильтрах колонки резко повышает ее

гидродинамическое сопротивление [64]. Такой подход в настоящее время не используется.

Современные методы подготовки биологических проб, используемые в ТЛМ, направлены либо на удаление мешающих компонентов (осаждение белка) с последующим анализом супернатанта, либо на извлечение определяемого вещества из биологической матрицы (методы экстракции).

Осаждение белка. Метод осаждения белка используется или как самостоятельный метод подготовки пробы, или как промежуточная стадия для других методов. Эта процедура простая, быстрая и недорогая и поэтому довольно распространена при подготовке проб биологических жидкостей, содержащих белки. Белки осаждают добавлением к пробе органических растворителей, неорганических солей или сильных кислот с последующим центрифугированием [22-24, 33, 36, 37, 54, 57, 65-68]. Для избежания потерь аналита важно, чтобы добавление любого из этих реагентов разрушало комплекс белок-лекарственное вещество. Кратность разбавления образца при добавлении осадителя варьируется от 1 до 5, чаще 2-3, а степень извлечения определяемого вещества обычно находится в интервале 90-100%. После центрифугирования надосадочную жидкость (супернатант) вводят в хроматографическую систему. Достаточно часто для повышения чувствительности супернатант упаривают досуха, сухой остаток растворяют в подходящем растворителе или в самой ПФ и инжектируют в колонку [33, 37, 67].

Наиболее удобным реагентом для осаждения белков с последующим анализом супернатанта методом ВЭЖХ с УФ детектированием является ацетонитрил – он используется авторами в подавляющем большинстве работ. Высокое содержание ацетонитрила в образце (50% и выше) снижает эффективность колонки с ОФ, что наиболее заметно при анализе гидрофильных веществ. Для решения этой проблемы применяют экстракцию ацетонитрила из супернатанта хлороформом или хлористым метиленом. Кроме ацетонитрила при этом экстрагируются и липиды. Такой простой прием позволяет повысить эффективность колонки, увеличить чувствительность анализа и, что особенно важно, продлить "время жизни" колонки вследствие удаления липидных компонентов пробы [68].

После осаждения белка в пробе остается довольно большое количество эндогенных компонентов, которые мешают при анализе проб с низкими концентрациями ЛВ. Кроме этого, в пробе остаются высокогидрофобные компоненты сыворотки, которые поздно элюируются и, тем самым, удлиняют время анализа. Более того, они могут вообще не элюироваться и аккумулироваться в колонке при каждом введении пробы, постепенно снижая ее эффективность. Однако, несмотря на все вышперечисленные недостатки, осаждение белка с последующим инжектированием супернатанта остается наиболее широко используемым методическим приемом в ТЛМ.

Жидко-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) – традиционный метод подготовки проб, требующих концентрирования определяемого вещества перед анализом. Экстракция ЛВ выполняется после осаждения белка [22, 57] или напрямую из биологической матрицы [49, 69-71]. Селективность экстракции зависит от различия коэффициентов распределения вещества-аналита и эндогенных компонентов матрицы.

Полярность ЛВ определяет выбор экстрагента, которыми могут быть хлороформ [69], хлористый метилен [70], толуол [57], этилацетат и некоторые другие эфиры [22, 49]. Повышение селективности экстракции достигают с помощью бинарных растворителей – хлороформ/изопропиловый спирт [71], гептан/этилацетат [72]. Для увеличения константы распределения вещество-аналит перед экстракцией часто переводят в молекулярную форму, для чего в пробу добавляют растворы минеральных кислот или оснований. После экстракции неполярными экстрагентами целевой раствор, наряду с определяемым веществом, содержит большое количество липидных компонентов плазмы (сыворотки). Одним из способов дальнейшей очистки экстракта может быть реэкстракция определяемого вещества слабыми растворами кислот или оснований [71, 72].

Степень извлечения ЛВ методом ЖЖЭ составляет обычно 70-90 % и при этом их концентрацию в инжектируемом экстракте можно повысить в 5-10 раз по сравнению с исходной пробой.

Недостаток ЖЖЭ – необходимость использования больших объемов высокочистых, дорогих и токсичных органических растворителей, а сама

процедура экстракции трудоемка, длительна и требует упаривания экстрагента (обычно несколько миллилитров). Кроме этого, ЖЖЭ мало применима для полярных соединений, константы распределения которых, как правило, низки. Хотя ЖЖЭ может быть автоматизирована [73], это сделать весьма сложно и такое оборудование пока мало распространено.

Твердофазная экстракция (ТФЭ) как метод подготовки пробы в ТЛМ используется весьма широко. Эффективность колонок-картриджей для ТФЭ составляет всего 50-100 тт, и их применение позволяет отделить только те компоненты, которые значительно отличаются по удерживанию от определяемого вещества. Применение двумерной (2D) ТФЭ обеспечивает более высокую селективность за счет использования ПФ, различающихся элюирующей силой и рН [74].

Наиболее распространенными стационарными фазами в ТФЭ до недавнего времени были ОФ С18 и С8. Сейчас стали использовать полимерные сорбенты, лишенные недостатков, характерных для обращенно-фазных сорбентов, синтезируемых на основе силикагеля: они пригодны для работы в широком интервале рН; обладают более высокой емкостью по отношению к полярным веществам, не требуют кондиционирования перед нанесением пробы [75]. Полимерные сорбенты универсальны: они пригодны для извлечения полярных и неполярных, нейтральных и ионогенных веществ. Для ТФЭ лекарственных веществ в ТЛМ часто используют картриджи Absolut Nexus (Varian, США) [76] и OasisTM HLB (Waters, США) [74]. Кроме полимерных сорбентов, в современной ТФЭ для извлечения полярных аналитов используются также комбинированные сорбенты, например, Bond Elut Certify [77], Bond Elut Certify II [78], которые представляют собой комбинацию ОФ С8 и ионообменников. Более высокую селективность ТФЭ по сравнению с комбинированными сорбентами обеспечивает последовательное применение картриджей, упакованных полимерным и ионообменным сорбентами, предложенное для основных ЛВ [79]. Появление современных сорбентов, не "боящихся" высыхания перед нанесением пробы, способствовало развитию оборудования для параллельной (много-канальной) ТФЭ.

При массовом анализе часто используется 96-камерная рабочая станция, которая позволяет одновременно обрабатывать до 96 образцов [74].

Для повышения производительности, кроме параллельной ТФЭ, используется и автоматизированная ТФЭ. В настоящее время известны два варианта автоматизации ТФЭ, которые в зарубежной литературе получили название "at-line" и "on-line".

Вариант "at-line" заключается в использовании роботизированных систем с традиционными одноразовыми или многоразовыми картриджами, когда оператор задает алгоритм, а затем обработанная проба попадает в хроматограф. Примером такой автоматизированной системы является ASPEC XL (Gilson, Франция-США) [80]. Эти системы довольно дороги и используются в рутинном анализе только в крупных аналитических лабораториях, где требуется высокая производительность.

Вариант "on-line" основан на методе переключения колонок. Этот вариант является модификацией традиционной ВЭЖХ с предколоной. Проба инжектируется в предколону, которая в это время отсоединена от аналитической колонки. Предколону промывается по соответствующей программе растворителями и только затем, с помощью дополнительного крана, соединяется с аналитической. Этим самым исключается попадание в аналитическую колонку нежелательных веществ. После разделения предколону снова отсоединяется от аналитической и освобождается от сильноудерживаемых веществ. Затем цикл повторяется. Вариант "on-line" реализуется с помощью относительно простого оборудования и поэтому он все чаще используется при анализе биологических проб, в том числе и в ТЛМ. Возможность применения многоразовых экстракционных предколонок многократно снижает стоимость анализа. Чувствительность этого метода выше, так как степень извлечения вещества составляет, как правило, 100%.

Главным лимитирующим фактором режима "on-line" является ограниченное время эксплуатации экстракционной колонки, которое зависит от характера и объема инжектируемой пробы. На колонке, упакованной ОФ сорбентом С8 (10x4,6 мм) при прямом нанесении сыворотки можно выполнить анализ 75-100 проб (7,5-10 мл сыворотки) [44]. Осаждение белков перед нанесением пробы на

экстракционную колонку позволяет выполнять до 500 анализов (15 мл сыворотки) на экстракционной колонке C1(10x2,0 мм), но снижает степень извлечения определяемых ЛВ до 85-95% [81]. Для увеличения времени эксплуатации ОФ экстракционной колонки обычно выполняют обратную промывку колонки "сильной" ПФ после анализа нескольких проб.

Интересным способом увеличения "времени жизни" колонки является использование для ее упаковки сорбентов с "ограниченным доступом". Сорбенты с "ограниченным доступом" ("restricted-access media", "RAM", бифильные сорбенты) имеют внешнюю гидрофильную и внутреннюю гидрофобную поверхность. Такие сорбенты применяются для прямого введения биологических жидкостей, при этом высокомолекулярные компоненты пробы, например, белки, элюируются в свободном объеме колонки, а низкомолекулярные компоненты, диффундируя во внутреннее пространство частицы сорбента, удерживаются на ее внутренней поверхности и разделяются. К настоящему времени синтезировано несколько видов бифильных сорбентов, различающиеся свойствами исходного силикагеля и типом модификатора, но чаще всего используются алкилдиолсиликагели (ОФ-18 АДС или ОФ-8 АДС) [82-84]. Для гидрофильных ЛВ, которые плохо удерживаются даже на ОФ-18 АДС синтезирован LiChrospher 60 XDS (SO₃/Diol), содержащий сульфогруппы на внутренней поверхности сорбента [85].

Объем применяемой экстракционной колонки определяет объем наносимой пробы и, следовательно, чувствительность анализа. Типичная экстракционная колонка имеет объем 0.03-0.3 мл, объем пробы при этом составляет 50-100 мкл. Применение экстракционных колонок большего размера, например, 10x10 мм (V≈ 0,8 мл), позволяет наносить пробу сыворотки до 1-2 мл и, тем самым, существенно повысить чувствительность определения [86].

Хотя бифильные фазы предназначены именно для прямого нанесения биологических проб, опасность осаждения белка все-таки существует, если ПФ для элюирования определяемого вещества с экстракционной колонки на аналитическую содержит более 10-20% органического растворителя. Чтобы предотвратить денатурацию белка необходимо также контролировать ионную силу и рН ПФ [87]. При соблюдении всех этих условий суммарный объем вводимой в

колонку с бифильной фазой неразбавленной плазмы может достигать 50-100 мл [83, 84].

2.7. Валидация биоаналитических методов.

В последнее десятилетие большое внимание уделяется валидации методов анализа. Валидация биоаналитических методов, т.е. методов, которые применяются для определения ЛВ и их метаболитов в биологических объектах, является обязательным условием при использовании их в официальных лабораториях. В США "Правила..." для валидации биоаналитических методов сформулированы US FDA в мае 2001 г. [88].

В соответствии с этими "Правилами..." обязательное требование - предварительная валидация используемого аналитического оборудования, которая выполняется в соответствии со стандартной процедурой.

Валидация аналитического метода состоит из:

- валидации подготовки стандартных образцов (СО);
- валидации аналитической методики (первичную);
- валидации аналитической методики в рутинной практике;
- валидации документации.

Основным условием правильности подготовки СО является документально подтвержденное содержание основного вещества. Согласно "Правилам...", валидацию аналитической методики (первичную) рекомендовано проводить, оценивая следующие показатели: селективность, точность, воспроизводимость, степень извлечения, правильность построения градуировочной зависимости, стабильность пробы. Для каждого из них рекомендована своя процедура оценки (минимально возможное число проб, их концентрации, число параллельных определений, допустимые отклонения). Указано, что правильность и воспроизводимость применяемых методик не должны быть хуже 15% (для предела обнаружения 20%).

В процессе рутинного использования валидированной методики контроль правильности и воспроизводимости рекомендовано проводить, анализируя

контрольные (стандартные) образцы, приготовленные во всем интервале определяемых концентраций. Отклонение от номинального значения по меньшей мере четырех из каждых шести контрольных образцов не должно превышать 15%. Документация должна соответствовать установленным требованиям и должна быть доступна для аудита и инспекций.

В Российской Федерации валидация аналитических методов для контроля качества лекарственных средств принята для фармацевтических предприятий и нормативно закреплена в ОСТ 42-510-98 [89]. Нормативных документов, касающихся валидации аналитических методов, применяемых в клинической практике, нам найти не удалось. В соответствии с Приказом МЗ РФ №45 от 7.02.2000 г. контроль качества аналитических методик должен проводиться путем оценки сходимости при проведении 10-20 параллельных определений, и он распространяется только на определение биохимических показателей крови и мочи [90].

2.8. Заключение.

Обзор литературных данных по ВЭЖХ-анализу лекарственных соединений, рекомендованных для ТЛМ, показывает, что существуют общие подходы к определению ЛВ в биологических жидкостях.

Подавляющее число определений выполняется на обращенных фазах С18 различных торговых марок, обладающих некоторыми сходными характеристиками (форма и диаметр зерна, размер пор, плотность прививки, эндкеппинг), но существенно различающиеся селективностью.

Различия в селективности используемых сорбентов зачастую обуславливают разнообразие используемых ПФ, хотя достаточно часто применяется бинарная ПФ ацетонитрил-водный буфер (рН 3). Концентрация ацетонитрила в ПФ варьируется в широких пределах, в зависимости от определяемого соединения, так как в ТЛМ используется обычно изократический режим элюирования.

Детекторы, чаще всего используемые в ТЛМ - УФ-спектрофотометры с перестраиваемой длиной волны. Применение детекторов с многоканальной регистрацией повышает достоверность идентификации пиков, позволяет оценивать их гомогенность, но высокая стоимость таких детекторов ограничивает их применение в рутинном анализе.

Подготовка пробы в ТЛМ зависит от концентрации определяемого ЛВ, его физико-химических свойств. Традиционные методы подготовки пробы включают в себя осаждение белка, ТФЭ или, реже, жидко-жидкостную экстракцию. К современным методам можно отнести применение предколонок, заполненными сорбентами с "ограниченным доступом".

Обращает на себя внимание тот факт, что в ТЛМ практически для каждого ЛВ существует своя методика определения, предполагающая определенный сорбент, определенные элюенты, детектор, методику подготовки пробы. Работ, где в одних условиях определяется несколько различных ЛВ, очень мало, хотя очевидно, что необходимость анализа различных ЛВ в рамках одной лаборатории при большом разнообразии методик ведет к увеличению продолжительности анализа, требует высокой квалификации персонала и, в конечном итоге, существенно повышает стоимость анализа. Эту стоимость можно заметно снизить путем унификации

условий подготовки пробы и условий хроматографического разделения, и такой подход для анализа ЛВ в биологических объектах используется в токсикологическом скрининге, где он обусловлен самой аналитической задачей [91, 92]. Аналогичный подход к определению терапевтических ЛВ позволил бы широко внедрить этот метод в рутинную практику. Решение этой проблемы представляется нам актуальной задачей.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

3.1. Оборудование.

В работе использовали микроколоночный жидкостный хроматограф "Милюхром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск) с колонками $\varnothing 2 \times 75$ мм, заполненными сорбентами Nucleosil 100-5 C18, Nucleosil 100-5 C18 PAH, Nucleosil 100-5 C18 AB и Nucleosil 300-5 C8 (Macherey-Nagel, Германия); Kromasil-100-5-C18, Kromasil-100-5-C8 и Kromasil-100-5-C4 ("EKA Chemicals" (Швеция).

Центрифуга ОС-6МУХЛ (6000 об./мин), рН метр-иономер И-120.2.

3.2. Материалы.

В качестве стандартных (контрольных) веществ были использованы фармацевтические субстанции ЛВ, содержание основного вещества в которых не ниже 98%.

В качестве реагента для модификации вальпроевой кислоты использован *n*-бромфенацил бромистый ("Sigma", США).

Для приготовления элюентов и обработки проб использованы: ацетонитрил (сорт 1) и гексан фирмы "Криохром" (Санкт-Петербург); трифторуксусная кислота ("Sigma", США), уксусная кислота, фосфорная кислота, перхлорат лития квалификации не ниже "х.ч". Хлористый метилен, метанол и триэтиламин были перегнаны перед использованием. Дистиллированная вода была дополнительно очищена с помощью системы "Norganic, Millipore Corporation" (США).

3.3. Методы

3.3.1. Условия хроматографического определения ЛВ.

Элюенты и режимы элюирования. В качестве элюента А использовали 0,2 М $\text{LiClO}_4 - \text{H}_3\text{PO}_4$ (рН 3); элюент Б - MeCN. При определении индивидуальных противосудорожных препаратов (ПСП) использовали изократическое элюирование. Содержание ацетонитрила в ПФ для каждого из определяемых соединений приведено в Главе 4 (п. 4.3). При определении двух и более ПСП применяли градиентное элюирование: 2000 мкл от 10 до 30% Б; 1000 мкл 30% Б.

При определении метотрексата применяли следующий режим градиентного элюирования: 2200 мкл от 5 до 20% Б; 1000 мкл 20% Б.

Циклоспорин А определяли при градиентном элюировании: 2500 мкл от 50 до 80% Б; 1000 мкл 80% Б.

Скорость потока элюента при всех режимах была 150 мкл/мин.

Длины волн детектирования для каждого из определяемых соединений приведены в Главе 4 (п. 4.4.1)

Температура колонки. При определении циклоспорина А температура колонки в процессе разделения была 70°C; при совместном присутствии в пробе дифенина и карбамазепина - 55°C; во всех остальных случаях - 40°C.

Запись УФ-спектров. Для записи УФ-спектров готовили стандартные растворы определяемых соединений с концентрацией 0,2 мг/мл. В качестве растворителей для приготовления стандартных растворов использовали: метанол (гексамидин, фенобарбитал, ламиктал, дифенин, карбамазепин); воду (этосуксимид, метотрексат); смесь ацетонитрил - вода (циклоспорин А); нейтрализованный реакционный раствор (*para*-бромфенациловый эфир вальпроевой кислоты). Спектры записывали во время хроматографического анализа после остановки потока вблизи максимума пика (интервал длин волн 190 - 360 нм, шаг 2 нм).

3.3.2. Отбор и хранение проб крови.

Для определения максимального содержания ПСП кровь из локтевой вены отбирали через 1,5-2 часа после утреннего приема препарата или в течение суток в заданное время. Для определения минимальной концентрации циклоспорина А кровь из локтевой вены отбирали за 1-2 часа до утреннего приема препарата. Для определения содержания метотрексата пробы крови отбирали через подключичный катетер через установленные интервалы времени после начала инфузии метотрексата (9 проб в процессе инфузии и 9-11 проб после ее окончания).

После добавления к цельной крови 1 капли раствора гепарина, плазму отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Аликвоту плазмы анализировали или хранили при - 20°C до анализа.

3.3.3. Удаление липидов из сыворотки крови.

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

3.3.4. Удаление белков из сыворотки крови.

После отделения удаления липидов к сыворотке крови добавляли 0,6 М раствор перхлората лития в ацетонитриле, содержащем 1% уксусной кислоты, в соотношении 1:1 по объему, центрифугировали и верхний слой (супернатант) использовали для работы.

3.3.5. Подготовка пробы сыворотки крови для определения гексамидина, фенобарбитала, бензонала, ламиктала, дифенина, карбамазепина и метотрексата.

В пробирку вносили 120 мкл сыворотки крови и проводили обработку в соответствии с п. 3.3.3. В две пробирки помещали по 50 мкл обработанной сыворотки и осаждали белки в соответствии с п. 3.3.4. Аликвоту супернатанта (5-20 мкл) инжектировали в колонку.

3.3.6. Подготовка пробы для определения этосуксимида.

В пробирку вносили 200 мкл сыворотки крови, содержащей этосуксимид и обрабатывали в соответствии с п. 3.3.3. В две пробирки помещали по 80 мкл обработанной сыворотки и осаждали белки в соответствии с п. 3.3.4. Аликвоту супернатанта (2 мкл) инжектировали в колонку. Если концентрация этосуксимида в исходной сыворотке была ниже 3,3 мкг/мл, то в каждую пробирку, содержащую супернатант, добавляли по 200 мкл хлористого метилена для экстракции

ацетонитрила, встряхивали и после разделения слоев 2-10 мкл верхнего раствора инжесктировали в колонку.

3.3.7. Подготовка пробы для определения вальпроевой кислоты.

Вальпроевую кислоту в сыворотке крови определяли в виде *пара*-бромфенацилового эфира, методика получения которого была любезно предоставлена Г.Г.Шамовским (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск). Подготовка пробы проводилась следующим образом: для удаления липидов к 200 мкл сыворотки крови добавляли 1 мл гексана, встряхивали 5 мин и гексановый слой отбрасывали. Для экстракции вальпроевой кислоты к оставшемуся водному слою добавляли 200 мкл 2 М водного раствора H_3PO_4 , 1 мл гексана, встряхивали 5 мин и разделяли слои центрифугированием. 500 мкл верхнего гексанового слоя переносили в другую пробирку и упаривали досуха в токе аргона. Для получения *пара*-бромфенацилового эфира к остатку приливали 400 мкл раствора *пара*-бромфенацила бромистого в ацетонитриле (5 мг/мл), 20 мкл раствора триэтиламина в ацетонитриле (28 мг/мл) и выдерживали при комнатной температуре 1 час. К пробе добавляли 10 мкл 2 М водного раствора H_3PO_4 и хроматографировали. Производное стабильно не менее суток.

3.3.8. Подготовка пробы для определения клоназепам.

К 1,1 мл сыворотки крови, содержащей клоназепам, добавляли 5 мл гексана для удаления липидов. 1 мл обработанной сыворотки переносили в другую пробирку. Клоназепам экстрагировали из обработанной сыворотки следующим образом: к 1 мл сыворотки добавляли 50 мкл 2 М водного раствора КОН и 1 мл хлористого метилена, встряхивали 5 мин и отделяли нижний слой раствора, содержащий клоназепам. К оставшемуся водному раствору добавляли еще 1 мл хлористого метилена, повторяли экстракцию, экстракты объединяли и упаривали досуха в токе аргона. Остаток растворяли в 50 мкл раствора ацетонитрил-вода (1:1) и 20 мкл этого раствора инжесктировали в колонку.

3.3.9. Подготовка пробы для определения циклоспорина А.

Из 1,2 мл сыворотки крови удаляли белок в соответствии с п. 3.3.4. После этого 2,2 мл супернатанта помещали в пробирку, добавляли 2,2 мл хлористого метилена, энергично встряхивали в течение 5 мин и центрифугировали для разделения слоев. Верхний (водный) слой удаляли, в другую пробирку переносили аликвоту нижнего слоя (хлористый метилен-ацетонитрил) объемом 3 мл и упаривали досуха в токе аргона при 40°C. Для экстракции липидов остаток растворяли в 140 мкл 50%-ного водного ацетонитрила, содержащем 1% трифторуксусной кислоты, добавляли 1 мл гексана и встряхивали 5 мин. После разделения слоев 100 мкл нижнего слоя (вода-ацетонитрил) инжесктировали в колонку.

3.3.10. Оценка степени извлечения из сыворотки крови клоназепама и циклоспорина А.

Степень извлечения клоназепама и циклоспорина А из сыворотки оценивали путем добавки известных количеств этих соединений в образцы донорской сыворотки. Пробы с добавкой обрабатывали в соответствии с методиками. Степень извлечения рассчитывали как отношение площадей пиков веществ на хроматограммах экстракта сыворотки и стандартного раствора.

3.3.11. Определение градуировочных зависимостей для ЛВ.

Градуировочные растворы для всех определяемых ЛВ готовили путем добавления 10 мкл стандартных растворов этих ЛВ с подходящей концентрацией к 200–4000 мкл донорской сыворотки. Далее пробы обрабатывались в соответствии с методиками. Градуировочная зависимость для каждого определяемого ЛВ получена для пяти концентраций (n=10).

3.3.12. Оценка селективности и специфичности методик анализа.

Влияние эндогенных компонентов сыворотки крови для каждого определяемого ЛВ оценивали путем анализа 10 различных образцов сыворотки крови как доноров, так и пациентов, не принимающих этот препарат.

Оценку селективности разработанных ВЭЖХ-методик (включая подготовку пробы) выполняли для каждого определяемого противосудорожного препарата путем добавок других ПЭП, используемых при проведении комплексной терапии.

3.3.13. Оценка метрологических характеристик методик анализа.

Предел обнаружения (PrO) для каждого определяемого вещества рассчитывали как минимальную концентрацию этого соединения в исходной сыворотке крови, для которой отношение "сигнал/шум" в инъецируемой пробе равно 3. Относительное стандартное отклонение и отклонение от номинального значения при этом были менее 20%.

Предел количественного определения рассчитывали как концентрацию определяемого соединения в исходной сыворотке, для которой отношение "сигнал/шум" в инъецируемой пробе равно 10. Относительное стандартное отклонение и отклонение от номинального значения при этом были менее 15%.

Оценку воспроизводимости во всем интервале определяемых концентраций для всех определяемых соединений выполняли, используя модельные образцы, приготовленные на основе донорской сыворотки (n=10).

Влияние матрицы оценивали по воспроизводимости методик определения фенобарбитала, карбамазепина и ламиктала с использованием результатов анализа рабочих (реальных) проб (n=20).

Правильность метода оценивали методом добавок при количестве параллельных определений для каждой концентрации не менее 5.

Линейность метода для каждого ЛВ оценивали в интервале рабочих концентраций.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

4.1. Выбор масштаба ВЭЖХ.

Как было нами отмечено в Главе 2, длина хроматографических колонок, используемых в ТЛМ, варьируется от 100 до 250 мм, а их внутренний диаметр составляет 4,0-4,6 мм. При этом в настоящее время около 50% разделений в ТЛМ выполняется на колонках длиной 100-150 мм. Применение коротких колонок – один из возможных путей снижения стоимости анализа за счет сокращения его длительности и уменьшения расхода ПФ [16-18]. Уменьшение диаметра колонки при сохранении нагрузки на сорбент приводит к повышению чувствительности анализа, что, в свою очередь, снижает требования к чистоте растворителей [18]. Очевидно, что одновременное уменьшение длины и диаметра колонки по сравнению со "стандартной" колонкой позволяет получить существенные выгоды [17]. Простой расчет показывает, что применение колонки размером $\varnothing 2 \times 75$ мм взамен традиционной ($\varnothing 4,6 \times 250$ мм) в 10–20 раз снижает расход растворителей и во столько же раз повышает чувствительность определения.

ВЭЖХ на колонках $\varnothing 2 \times 75$ мм мы считаем оптимальным масштабом для целей ТЛМ. Дальнейшее уменьшение колонки до размеров капиллярной представляется нецелесообразным, так как ее нельзя использовать в сочетании со стандартным аналитическим хроматографическим оборудованием (инжекторы, насосы, ячейка детектора), оборудование, специально разработанное для капиллярной ВЭЖХ, пока слишком дорого и поэтому мало пригодно для рутинного анализа. 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.

4.2. Выбор неподвижной фазы.

Для определения лекарственных веществ в ТЛМ используются обращенные фазы C8 и C18 различных торговых марок, 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), некоторые характеристики которых приведены в таблице 3.

Таблица 3. Некоторые характеристики исследованных ОФ

№ п/п	Название ОФ	Площадь поверхности, м ² /г	Содержание углерода, % (по весу)	Эндкеппинг
1.	Nucleosil [®] 300-5 C8	100	2, мономер	да
2.	Nucleosil [®] 100-5 C18	350	14, мономер	да
3.	Nucleosil [®] 100-5 C18 АВ	350	25, полимер	спец.
4.	Nucleosil [®] 100-5 C18 РАН	350	(-)*, полимер	(-)*
5.	Kromasil [®] 100-5 C4	340	8, мономер	да
6.	Kromasil [®] 100-5 C8	340	12, мономер	да
7.	Kromasil [®] 100-5 C18	340	19, мономер	да

Nucleosil[®] - торговая марка фирмы "Macherey-Nagel" (Германия).

Kromasil[®] - торговая марка фирмы "EKA Chemicals" (Швеция).

*)Данных нет.

Все ОФ были упакованы в колонки Ø2x75 мм и было изучено их поведение 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 Г) и Nucleosil 300-5-C8 (рис. 2 В). Остальные сорбенты при таком высоком содержании воды в ПФ "коллапсировали". Это явление характерно для фаз с высоким содержанием углерода – в данном случае ими были полимерные сорбенты Nucleosil 100-5-C18 АВ, Nucleosil 100-5-C18 РАН и мономерный сорбент Kromasil 100-5-C18 с высокой степенью прививки радикалов C18 (табл. 3). Содержание углерода для сорбентов Kromasil 100-5-C4 и Kromasil 100-5-C8 значительно ниже, но "полный" эндкеппинг, декларируемый для сорбентов этой марки, также способствует их склонности к коллапсу. Снижение

содержания воды в ПФ с 98 до 90% в начальной точке градиента лишь частично "снимает" коллапс сорбента Kromasil 100-5-C18 (рис. 2Г).

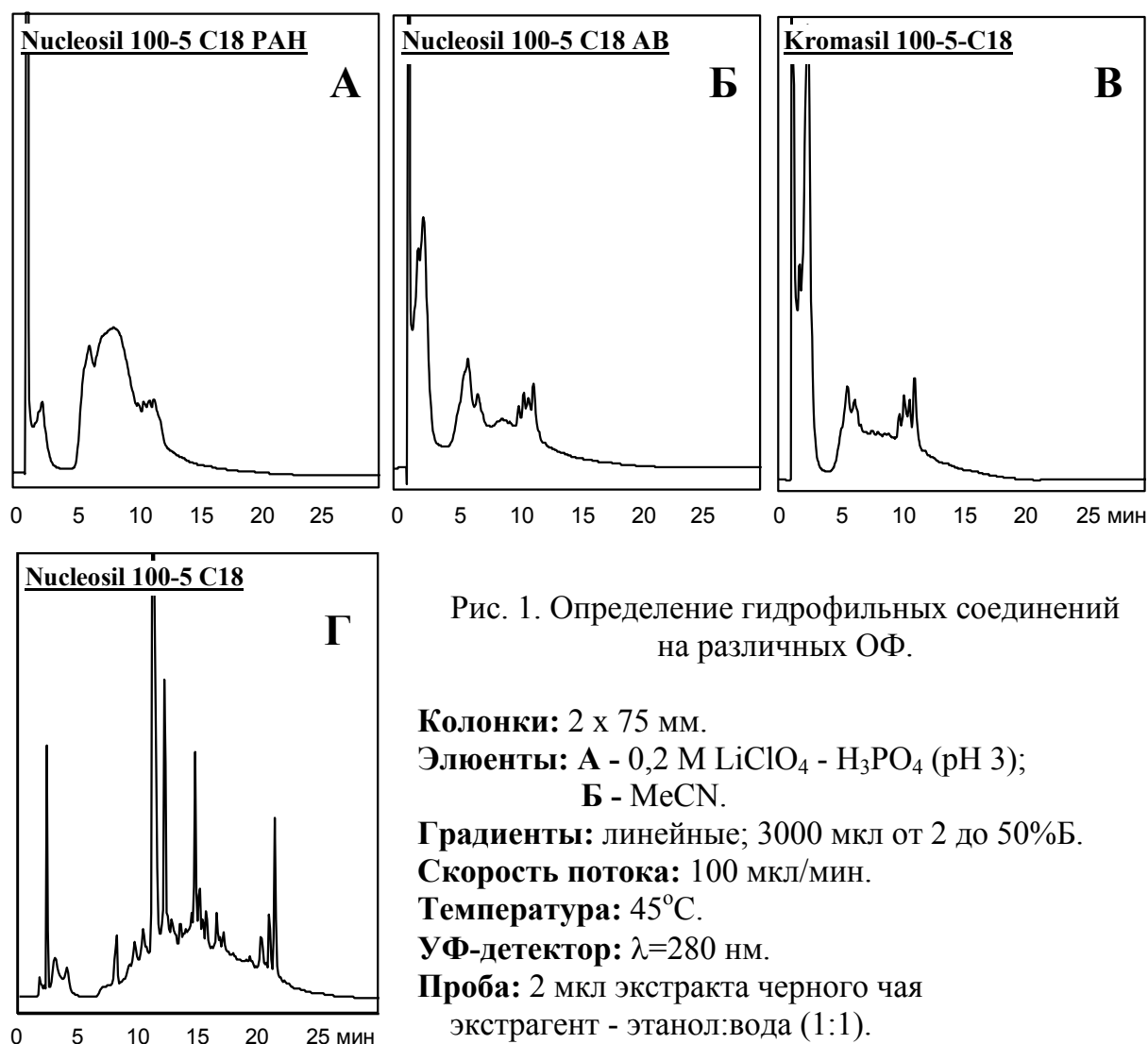


Рис. 1. Определение гидрофильных соединений на различных ОФ.

Колонки: 2 x 75 мм.

Элюенты: А - 0,2 М LiClO₄ - H₃PO₄ (рН 3);

Б - MeCN.

Градиенты: линейные; 3000 мкл от 2 до 50%Б.

Скорость потока: 100 мкл/мин.

Температура: 45°C.

УФ-детектор: λ=280 нм.

Проба: 2 мкл экстракта черного чая
экстрагент - этанол:вода (1:1).

Сравнение времен удерживания основных пиков гидрофильных соединений, на колонках с сорбентами Nucleosil 300-5-C8 и Nucleosil 100-5-C18 (рис. 1Г и рис. 2В) позволяет сделать вывод о более высокой селективности сорбента Nucleosil 100-5-C18, что обусловлено более высокой его емкостью. В связи с этим в дальнейшей работе мы использовали именно фазу Nucleosil 100-5 C18.

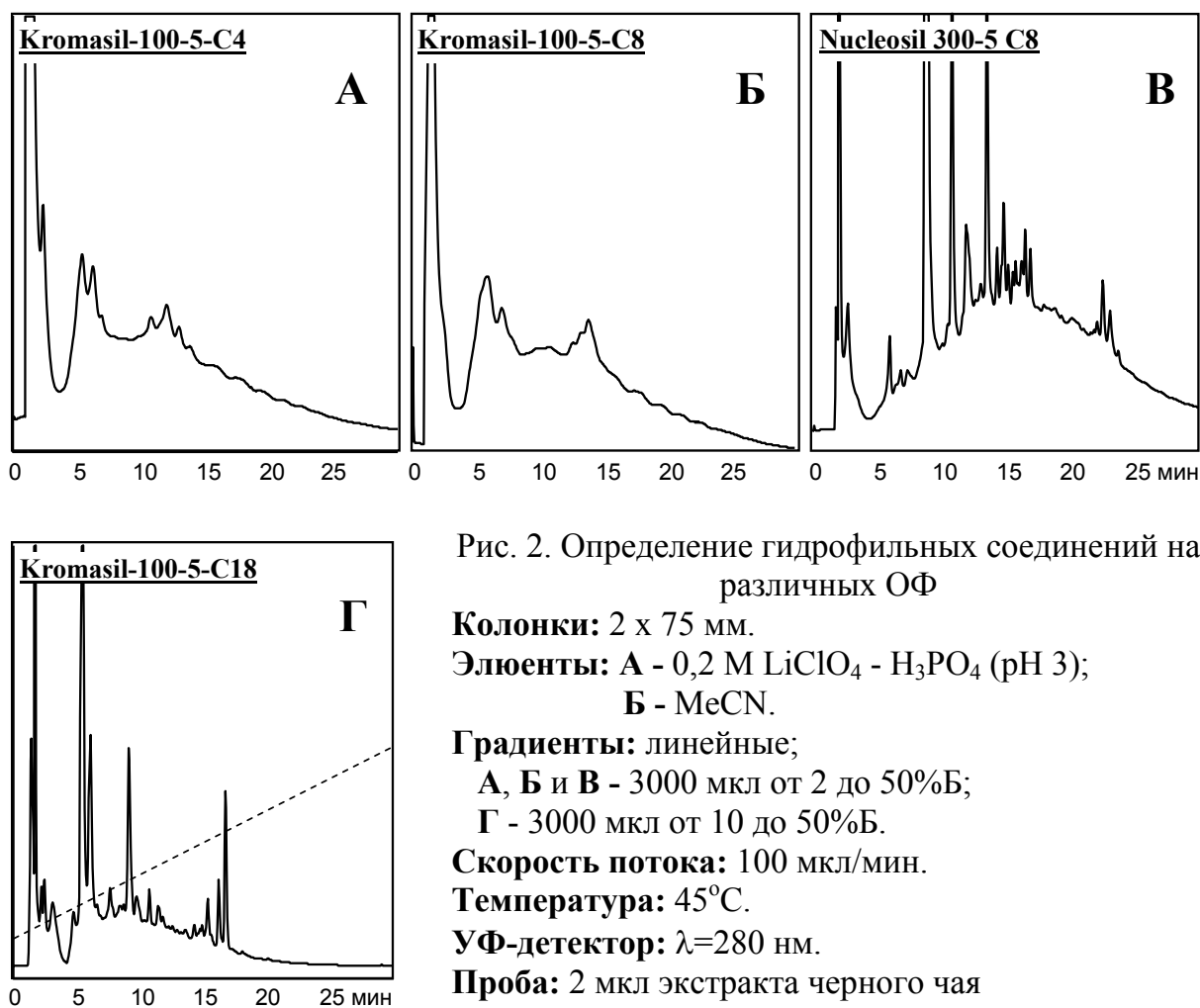


Рис. 2. Определение гидрофильных соединений на различных ОФ

Колонки: 2 x 75 мм.

Элюенты: А - 0,2 М LiClO₄ - Н₃РO₄ (рН 3);

Б - MeCN.

Градиенты: линейные;

А, Б и В - 3000 мкл от 2 до 50%Б;

Г - 3000 мкл от 10 до 50%Б.

Скорость потока: 100 мкл/мин.

Температура: 45°C.

УФ-детектор: λ=280 нм.

Проба: 2 мкл экстракта черного чая
экстрагент - этанол:вода (1:1).

Как было отмечено в Главе 2, важнейшей характеристикой используемой ОФ является наличие незэкранированных остаточных силанольных групп на поверхности сорбента, взаимодействие которых с исследуемыми соединениями нежелательно. Экранирование остаточных силанольных групп достигается как "эндкеппингом" неподвижной фазы, так и путем закисления подвижной фазы в сочетании с повышением ее ионной силы.

Выбранный нами сорбент Nucleosil 100-5 C18 является эндкеппированным, то есть остаточные силанольные группы силикагеля экранированы и хроматографические пики основных соединений на таком сорбенте должны быть симметричными. Для проверки этого предположения нами была записана хроматограмма специального 8-компонентного (тестового) раствора (рис. 3). Два его компонента – прозерин и трифтазин (структуры приведены в табл. 4) –

содержат основной атом азота и весьма чувствительны к наличию незкранированных силанольных групп сорбента.

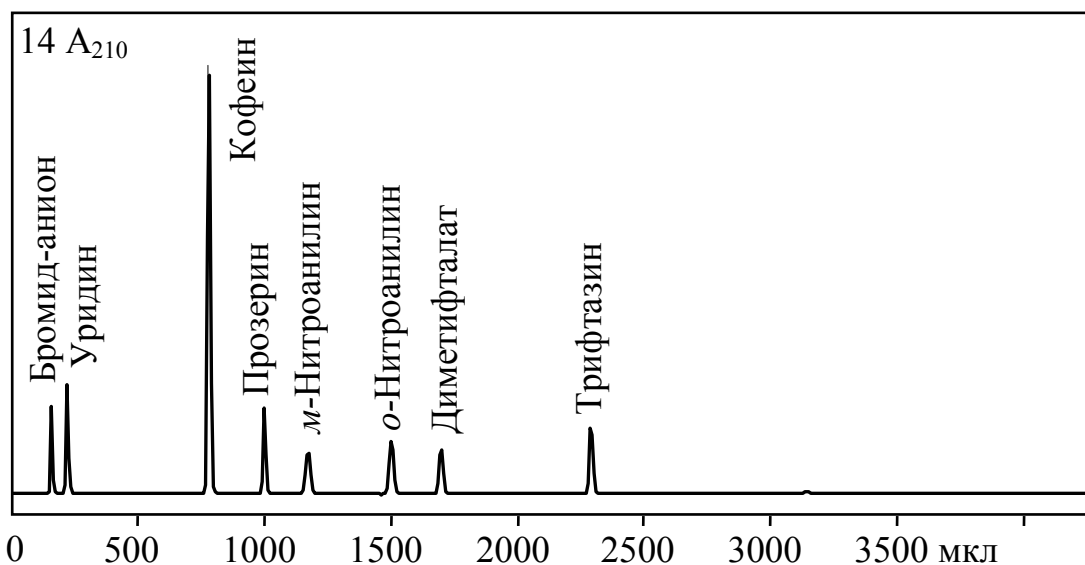


Рис. 3. Хроматограмма тестового раствора

Колонка: 2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18.

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - Н₃РO₄, рН 3. **Элюент Б:** АСN.

Градиент: линейный; 4000 мкл от 5 до 100%Б; 300 мкл 100%Б.

Скорость потока: 100 мкл/мин. **Температура:** 40°C. **УФ-детектор:** 210 нм.

Объем пробы: 5 мкл

Оба вещества на выбранном сорбенте хроматографируются в виде симметричных пиков. Коэффициенты асимметрии, рассчитанные на уровне 10% высоты пиков ($A_{10\%}$) равны 1,15 (прозерин) и 1,19 (трифтазин). Величины $A_{10\%}$, близкие к единице, свидетельствуют об отсутствии значимых ионообменных взаимодействий. Отметим, что хорошая симметрия пиков обусловлена также присутствием в ПФ перхлората лития, о котором будет говориться в следующем разделе. Таким образом, нами был сделан вывод, что ОФ Nucleosil 100-5 C18 "подходит" для хроматографического анализа основных ЛВ, способных взаимодействовать с открытыми силанольными группами сорбента.

4.3. Выбор подвижной фазы.

Хроматографический анализ ЛВ на ОФ-сорбентах достаточно часто выполняется при рН~3 и причины этого обсуждены в Главе 2. При длительной

эксплуатации колонки с ОФ при таком значении рН существует реальная вероятность, что в течение времени за счет отщепления от силикагеля радикалов С18 на поверхности сорбента будут образовываться свободные силанольные группы. Для того, чтобы заранее подавить эффект "силанолов", мы увеличили ионную силу ПФ путем введения в нее перхлората лития.

Перхлорат лития в составе подвижной фазы используется довольно редко, хотя авторы многих работ отмечают его способность подавлять ионообменные взаимодействия в растворе и сорбцию аминов на силанольных группах [30, 31, 93, 94]. Выбор оптимальной концентрации LiClO_4 в ПФ выполнен нами совместно с М.О.Родинко экспериментальным путем. Для этого в качестве тестовых выбрано 6 веществ, формулы которых приведены в табл. 4.

Концентрация LiClO_4 в водной части ПФ изменялась от 0 до 0,5 М. Зависимости объемов удерживания и ширины пиков на половине их высот от концентрации LiClO_4 приведены на рис. 4 и 5. Из этих рисунков видно, что изменение концентрации LiClO_4 заметно влияет на подвижность только двух соединений этой тестовой смеси, которые являются аминами.

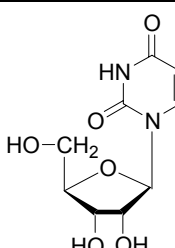
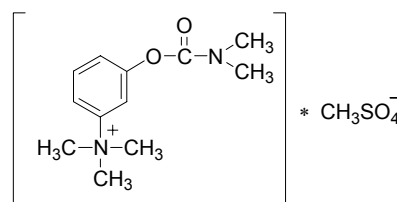
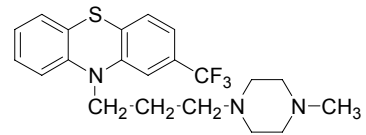
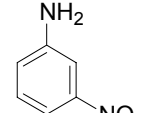
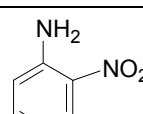
Увеличение объемов удерживания прозерина и трифтазина можно связать с образованием слабогидрофобных нейтральных ионных пар аминов с анионом ClO_4^- . Подвижности протонированного в этих условиях менее, чем на 50% *мета*-нитроанилина и незаряженных *орто*-нитроанилина и уридина не зависят от концентрации LiClO_4 . Изменение концентрации LiClO_4 не влияет также и на подвижность бромид-аниона, который в этой системе служит маркером свободного объема колонки. Резкое уменьшение полуширины пика для уридина, прозерина и трифтазина наблюдается при изменении концентрации перхлората лития от 0 до 0,2 М.

Изменение полуширины пика для *орто*- и *мета*-нитроанилинов и бромида не отмечено. Уменьшение полуширины пика аминов можно объяснить способностью перхлората лития подавлять ионообменные взаимодействия.

Таким образом, нами показано, что концентрация перхлората лития, равная 0,2 М, достаточна для подавления ионообменных взаимодействий и получения симметричных пиков, и, тем самым, может считаться оптимальной. Концентрация

ацетонитрила в ПФ и режим элюирования (изократический или градиентный) обсуждаются в последующих разделах.

Таблица 4. Структурные формулы тестовых соединений.

Соединение	Структурная формула	pK _a
Бромид калия	KBr	-
Уридин		pK _{a1} =9,0 pK _{a2} >13
Прозерин	 * CH ₃ SO ₄ ⁻	12
Трифтазин	 * 2HCl	8,1
<i>мета</i> -Нитроанилин		2,50
<i>орто</i> -Нитроанилин		-0,29

4.4. Выбор условий хроматографического определения.

4.4.1. Выбор длин волн детектирования.

При работе с УФ-детектором длина волны определяется, исходя из УФ-спектра определяемого соединения. Чаще всего такой длиной волны является длина волны, соответствующая максимальному поглощению раствора вещества или близкая к ней. Большая часть изучаемых ЛВ поглощает только в области коротких длин волн и длина волны детектирования для них обычно составляет 210 нм [95-102].

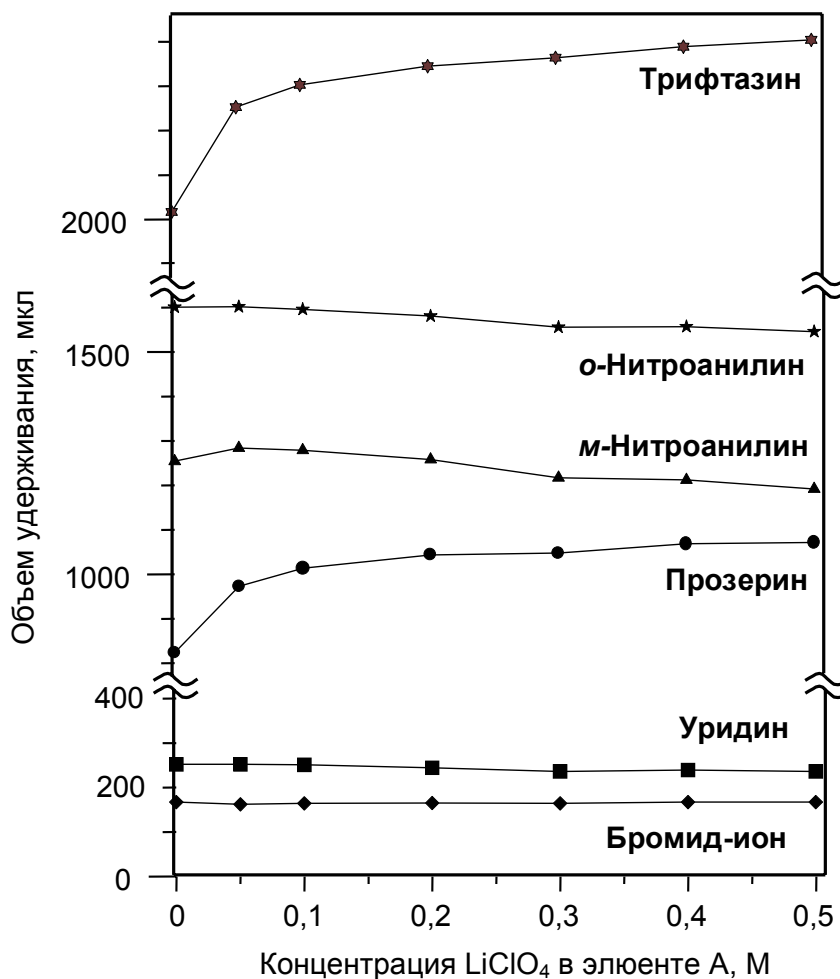


Рис. 4. Зависимость объемов удерживания компонентов тестовой смеси от концентрации перхлората лития в ПФ.

Вальпроевая кислота не поглощает в УФ-области спектра и ее определение выполняют в виде производных [103, 104]. В этом случае длина волны детектирования зависит от поглощения самого производного.

Нормированные УФ-спектры ЛВ приведены в *Приложении 3*. Длины волн максимального поглощения и детектирования приведены в таблице 5. В качестве базовой для всех соединений выбрана длина волны, близкая к длине волны максимального поглощения, за исключением метотрексата и клоназепама. Для этих соединений, имеющих вторые максимумы в длинноволновой области, в качестве базовой были выбраны длины волн $\lambda=300$ нм для метотрексата и $\lambda=310$ нм для клоназепама.

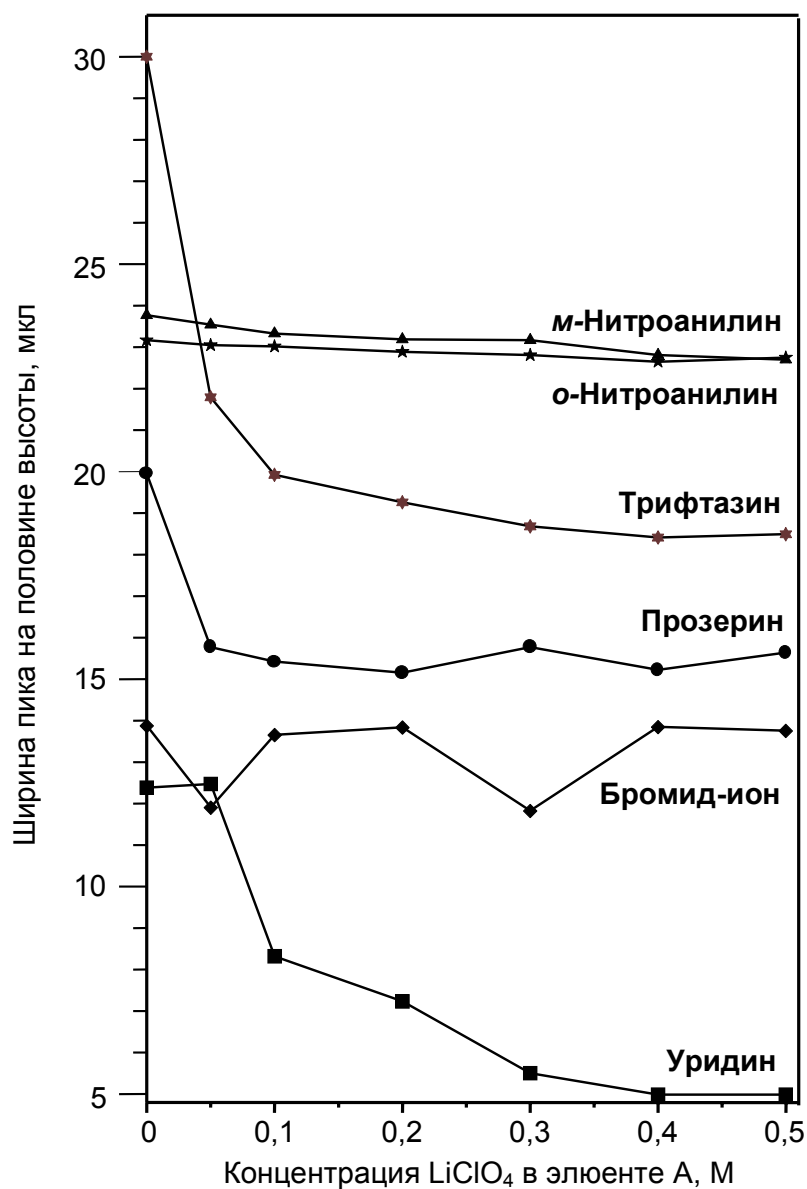


Рис. 5. Зависимость полуширины пика от концентрации LiClO₄.

Детектирование ЛВ в длинноволновой области позволяет минимизировать мешающее влияние эндогенных соединений плазмы крови и такой прием достаточно часто используется в ТЛМ [44, 70, 105]. Кроме этого, детектирование клоназепама при $\lambda=310$ нм позволяет уменьшить мешающее влияние карбамазепина в случае комплексной терапии.

Таблица 5. Длины волн максимального поглощения и детектирования определяемых соединений. Растворитель: MeCN- 0,2 М LiClO₄ (pH 3).

Определяемое соединение	λ_{max} , нм	$\lambda_{\text{дет}}$, нм
Фенобарбитал	194	<u>210</u> , 220, 230, 240
Карбамазепин	214, 284	<u>210</u> , 220, 230, 240
Гексамидин	194	<u>210</u> , 220, 230, 240
Ламиктал	212, 266	<u>210</u> , 220, 230, 240
Дифенин	198	<u>210</u> , 220, 230, 240
Клоназепам	196, 310	<u>310</u> , 320, 330, 340
Этосуксимид	196	<u>196</u> , 200, 210, 220
Вальпроевая кислота (в виде производного)	200, 256	250, <u>260</u> , 270, 280
Циклоспорин А	200	<u>200</u> , 204, 210, 214
Метотрексат	202, 304	280, <u>300</u> , 310, 320

Спектральные отношения для всех определяемых соединений, рассчитанные как отношение площадей пиков, зарегистрированных при длинах волн λ_x и $\lambda_{\text{баз}}$, приведены в *Приложении 3*.

Таким образом, выбранные нами длины волн позволяют определять каждое из исследуемых соединений на длине волны максимального поглощения или близкой к ней. Дополнительные длины волн используются для расчета спектральных отношений, применение которых для идентификации пиков существенно повышает надежность идентификации пиков на хроматограмме.

4.4.2. Элюенты и режим элюирования.

Противосудорожные препараты (ПЭП). Индивидуальные соединения определяют, как правило, с применением бинарных ПФ, состоящих из ацетонитрила (метанола) и буферного раствора. pH буферного раствора обычно находится в интервале 3-7 [70, 98-100, 106]. При pH выше 4 наиболее сильно

проявляются взаимодействия соединений основного характера с остаточными силанольными группами сорбента, поэтому для подавления этих взаимодействий в ПФ добавляют 0,1-0,5% триэтиламина (ТЭА) [105, 107, 108] или используют специальные сорбенты C18 [70]. При одновременном определении нескольких ПСП используются трех- или даже четырех-компонентные ПФ, состоящие из метанола, ацетонитрила, буфера и ТЭА [101, 102, 108].

Бинарный элюент состава ацетонитрил - 0,2 М LiClO₄ (рН 3), предлагаемый в данной работе, позволяет хроматографировать все определяемые соединения в виде симметричных пиков на "обычном" обращено-фазном сорбенте Nucleosil 100-5 C18, что свидетельствует об отсутствии значимых взаимодействий ПСП с остаточными силанолами силикагеля в данном элюенте. Кроме этого, LiClO₄ хорошо растворим в ацетонитриле и не поглощает в УФ-области спектра, что делает его удобным при проведении градиентного элюирования.

Изократическое элюирование, как уже было нами отмечено в Главе 2, является более экономичным и поэтому более предпочтительным при определении одного соединения. В таблице 6 приведено содержание ацетонитрила в ПФ, значения коэффициентов емкости (k') для данной концентрации ацетонитрила и значения коэффициентов асимметрии. Хроматограммы стандартных растворов ПСП, записанных в нижеприведенных условиях, приведены в *Приложении 3*. Пики всех определяемых соединений в данных условиях симметричны; коэффициенты $A_{10\%}$ составляют 1,02 - 1,15.

Концентрацию ацетонитрила в ПФ выбирали таким образом, чтобы было достигнуто полное отделение определяемого ПСП от эндогенных компонентов сыворотки крови при минимальном времени анализа. Коэффициенты емкости в выбранных условиях находятся в интервале 4-6, т.е. длительность определения одного соединения не превышает 10 минут.

Таблица 6. Содержание MeCN в ПФ и значения коэффициентов емкости (k').

Лекарственное вещество	Определяемое соединение	Содержание MeCN, %	k'	Коэффициент асимметрии, $A_{10\%}$
Фенобарбитал	Фенобарбитал	20	5,21	1,12
Бензонал	Фенобарбитал	20	5,21	1,12
Карбамазепин	Карбамазепин	30	4,49	1,12
Гексамидин	Гексамидин	15	3,94	1,12
	Фенобарбитал	15	10,61	1,12
Ламиктал	Ламиктал	20	5,66	1,02
Дифенин	Дифенин	30	4,61	1,12
Клоназепам	Клоназепам	35	4,06	1,15
Этосуксимид	Этосуксимид	10	4,14	1,15
Депакин	<i>n</i> -БФЭ ВК	65	6,16	1,08

Градиентное элюирование мы использовали при одновременном определении нескольких ПСП. При проведении комплексной терапии применяют одновременно до трех ПСП в различных сочетаниях. При определении гексамидина, активным метаболитом которого является фенобарбитал, мы также использовали градиентное элюирование. На рис. 6 приведена хроматограмма стандартного раствора шести ПСП.

Для разделения был выбран линейный градиент ацетонитрила от 10 до 30% за 2000 мкл, 30% 1000 мкл. Эти условия элюирования, например, позволяли определять любые сочетания ПСП, применяемые в практике Иркутской Государственной Областной детской клинической больницы.

Метотрексат (MTX). Метотрексат – гидрофильное соединение, которое может существовать в непротонированной или протонированной формах или в виде цвиттер-иона, в зависимости от pH растворителя (pK_a 3,36; 4,70; 5,71).

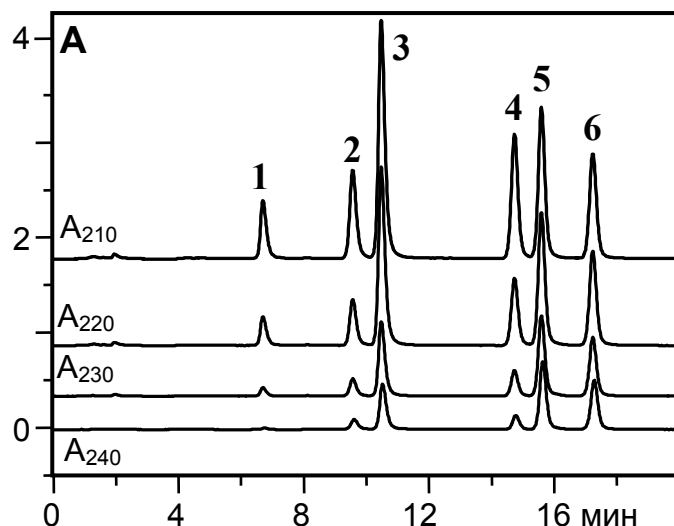


Рис. 6. Хроматограмма стандартной смеси ПСП.

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

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

Градиент: линейный; 2000 мкл от 10 до 30%Б. **Скорость потока:** 150 мкл/мин.

Температура: 55°С. **УФ-детектор:** 210, 220, 230, 240 нм.

Проба: 2 мкл стандартного раствора противосудорожных препаратов:

1– гексамидин; 2– фенобарбитал; 3 – ламиктал;

4– дифенин; 5– карбамазепин; 6– клоназепам.

Определение МТХ на обращенной фазе проводится обычно в бинарных системах MeCN-буфер (рН 2,6-6,0) [109-111]. Для увеличения удерживания в состав ПФ вводят тетраалкиламмоний в нейтральной среде [112, 113] или гексансульфокислоту в кислой среде [114] (ион-парная хроматография). В предложенном нами элюенте МТХ хроматографируется симметричным пиком с коэффициентом асимметрии 1,2 (рис. 7-И) в отсутствии ион-парного агента. Для определения МТХ в сыворотке крови был выбран режим градиентного элюирования. На рис. 7. приведены хроматограммы стандартного раствора МТХ в режиме изократического (I) и градиентного (II) элюирования. При близких временах удерживания (≈ 12 мин) высота пика МТХ в режиме градиентного элюирования примерно в 3,3 раза выше, так как концентрация ацетонитрила в ПФ в момент выхода пика выше ($\approx 17\%$ Б), чем при изократическом элюировании, где она составляет 10% Б. В данном случае градиентное элюирование обеспечивает

большую чувствительность определения МТХ, что является важным при проведении фармакокинетических исследований.

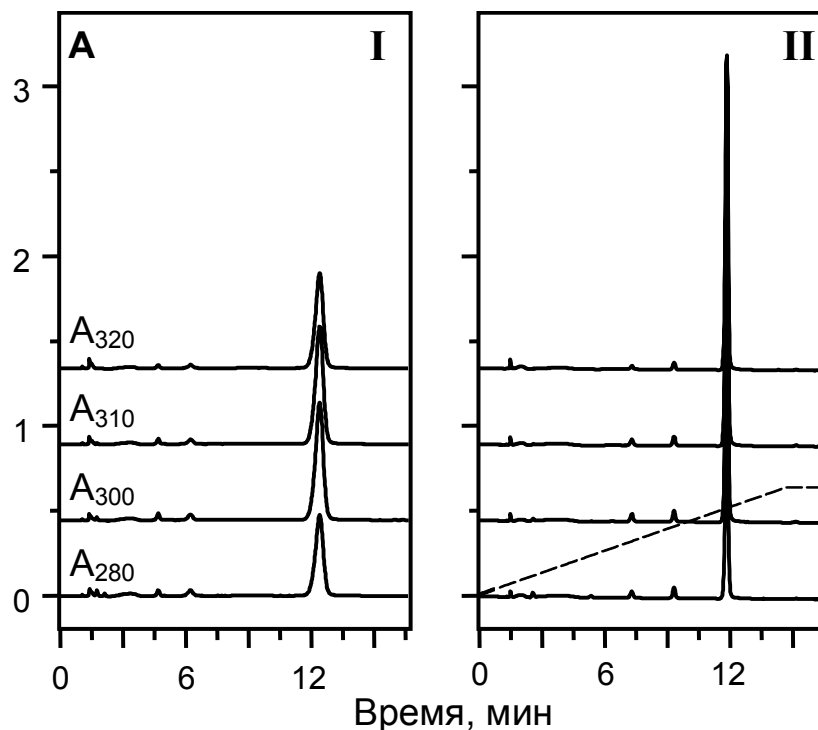


Рис. 7. Хроматограммы стандартного раствора метотрексата в режиме изократического (I) и градиентного (II) элюирования.

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

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

Подвижные фазы:

I- 10% Б; II-- линейный градиент, 2200 мкл от 5% до 20% Б; 500 мкл 20% Б

Скорость потока: 150 мкл/мин. **Температура:** 40°C. **УФ-детектор:** λ=300 нм.

Проба: 2 мкл стандартного раствора метотрексата в воде (0,5 мг/мл).

Циклоспорин А – циклический пептид, содержащий 11 остатков аминокислот. Хроматографическое определение на обращенной фазе выполняется в двух- или трехкомпонентных ПФ, состоящих из ацетонитрила, метанола и воды или буфера. рН буферного раствора изменяется от 3,5 до 6,5 [115-116].

В предложенном нами элюенте циклоспорин А хроматографируется симметричным пиком с коэффициентом асимметрии $A_{10\%}=1,09$ (Приложение 3). Применение градиентного элюирования позволяет повысить чувствительность определения циклоспорина А в 2 раза:

Режим элюирования	T _R , мин	% MeCN в момент выхода пика	Высота пика, е.о.п.
Изократический	11,84	55	0,17
Градиентный	12,99	80	0,38

4.4.3. Выбор температуры колонки.

Как отмечалось в Главе 2, ранее вопросам термостатирования не уделялось большого внимания и большинство работ в ТЛМ выполнялось обычно без термостатирования колонки. К настоящему времени показано, что термостатирование колонки является необходимым условием достижения хорошей воспроизводимости времен удерживания [20]. Кроме того, работа при повышенной температуре колонки позволяет уменьшить вязкость ПФ, снизить давление в колонке и повысить эффективность разделения. В данной работе практически все разделения мы проводили при 40°C, но в ряде случаев для достижения требуемого разрешения пиков температуру варьировали.

Разделение карбамазепина и дифенина. Карбамазепин и дифенин, сочетание которых часто используется на практике при лечении некоторых видов эпилепсии, можно разделить при температуре хроматографической колонки 40°C, только используя ПФ с низким содержанием ацетонитрила. Это снижает чувствительность определения, удлиняет время анализа и не позволяет одновременно определять другие ПСП. Для выбора условий, при которых достигается полное разделение карбамазепина и дифенина в присутствии других ПСП, наиболее часто применяемых при комплексном лечении, была исследована зависимость удерживания шести противосудорожных препаратов от температуры колонки.

При повышении температуры колонки времена удерживания веществ, как правило, уменьшаются. Эта зависимость отмечена для всех шести исследуемых ПСП (табл. 7).

Относительное удерживание обычно также уменьшается при повышении температуры колонки, что отмечено, например, для пары "фенобарбитал-ламиктал". Для пары "дифенин-карбамазепин" зависимость обратна - с

повышением температуры относительное удерживание увеличивается (рис. 8). В результате проведенных исследований показано, что оптимальной температурой для разделения карбамазепина и дифенина в присутствии других ПСП является 55°C (табл. 7). Относительное удерживание (α) пары "дифенин-карбамазепин" в этих условиях равно 1,16 (рис. 8), а степень разделения $R_s=1,6$ (при эффективности колонки 3000 т.т). Дальнейшее повышение температуры нецелесообразно, т.к. это приводит к ухудшению разделения для других соединений.

Таблица 7. Зависимость величины фактора емкости (k') ПСП при различных температурах колонки. Элюент: MeCN-0,2 M LiClO₄ (pH 3)=25:75.

Соединение	k'				
	35°C	40°C	45°C	50°C	55°C
Гексамидин	1,39	1,39	1,34	1,29	1,26
Фенобарбитал	3,72	3,55	3,35	3,11	2,96
Ламиктал	4,72	4,31	3,88	3,45	3,17
Дифенин	9,58	8,86	8,14	7,30	6,78
Карбамазепин	10,22	9,68	9,10	8,31	7,84
Клоназепам	16,21	14,35	13,06	11,75	10,88

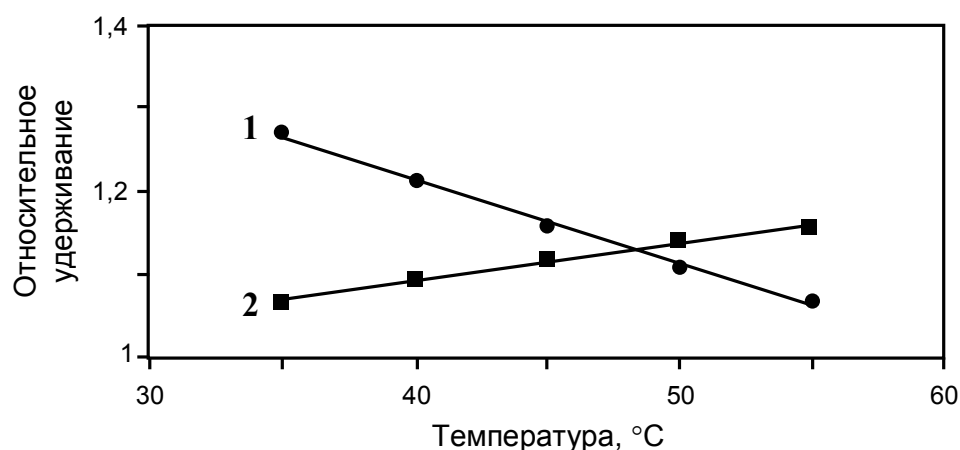


Рис. 8. Влияние температуры колонки на селективность разделения.

1- ламиктал-фенобарбитал; 2- дифенин-карбамазепин.

Определение циклоспорина А на ОФ С18 выполняют обычно при температуре 70-80°C [115]. Хроматографирование этого соединения на фазах меньшей емкости

(CN- или C₆H₆-) выполняют при 50°C и даже при комнатной температуре, в зависимости от используемого сорбента [117-119].

На рис. 9 приведены хроматограммы стандартного раствора готовой лекарственной формы циклоспорина А, полученные при температурах колонки от 40 до 70°C, упакованной сорбентом Nucleosil 100-5 C18. При температуре 40-60°C циклоспорин А хроматографируется в виде аномально широкого несимметричного пика, который обусловлен существованием стабильных конформеров в полярных растворителях [120] и неполным отделением от сопутствующих компонентов. Ниже приведены значения полуширины пика циклоспорина А и значение $A_{10\%}$ при различных температурах колонки:

Температура колонки, °С	Ширина пика циклоспорина А на уровне 50% высоты пика, мкл	$A_{10\%}$
40	1,0	1,39
50	0,6	0,65
60	0,5	0,72
70	0,3	1,09

При температуре 70°C пик циклоспорина А симметричен и полностью отделен от сопутствующих компонентов. В связи с этим все дальнейшие определения циклоспорина А проводились при температуре 70°C.

4.5. Подготовка пробы.

4.5.1. Удаление липидов.

Очень гидрофобные соединения, содержащиеся в сыворотке крови, могут сорбироваться на обращенной фазе C18, сокращая время эксплуатации хроматографической колонки. Полное удаление таких веществ из колонки возможно только при введении в состав ПФ таких растворителей, как ацетон, гексан, хлороформ, что, как правило, неудобно [121]. 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; $pH_{\text{сыв.}} \approx 7$) от 0,8 до 1,2 мг липидов, что составляет 10-20 % от их общего количества. Гексан является неденатурирующим довольно слабым экстрагентом и поэтому в данных условиях извлекает только свободные и слабосвязанные нейтральные вещества липидного характера.

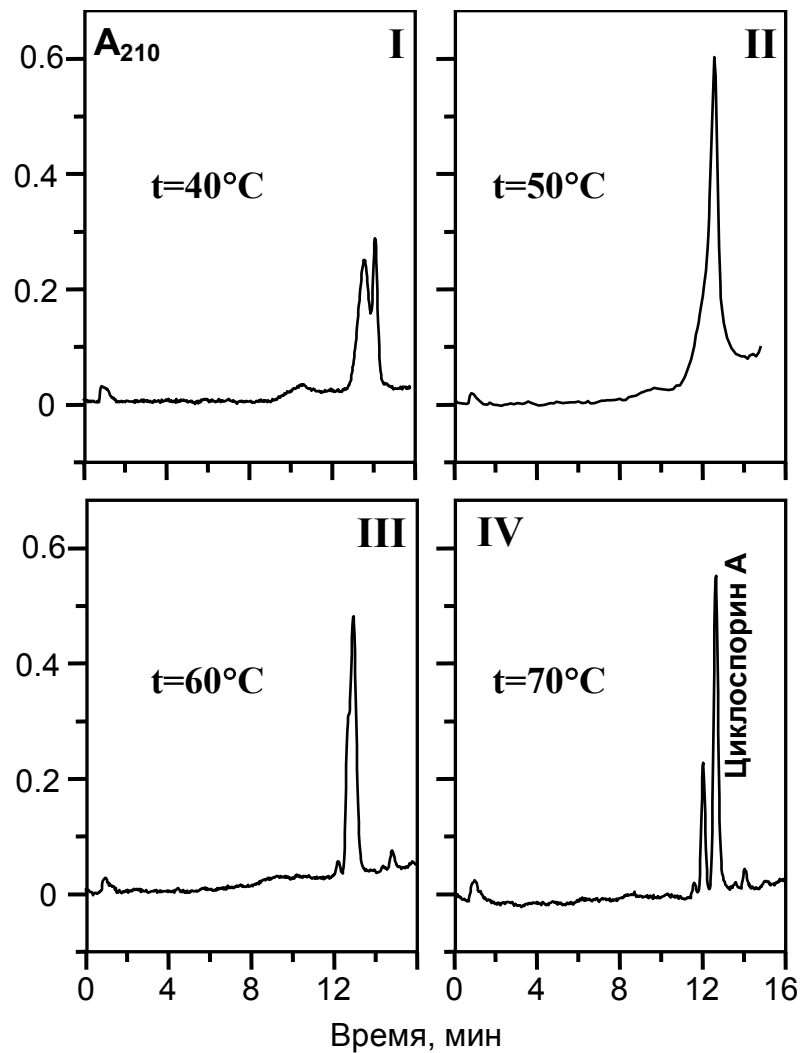


Рис. 9. Хроматограммы стандартного раствора лекарственной формы циклоспорина А (Neoral, Novartis) при различных температурах на колонке с ОФ Nucleosil 100-5 C18.

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).

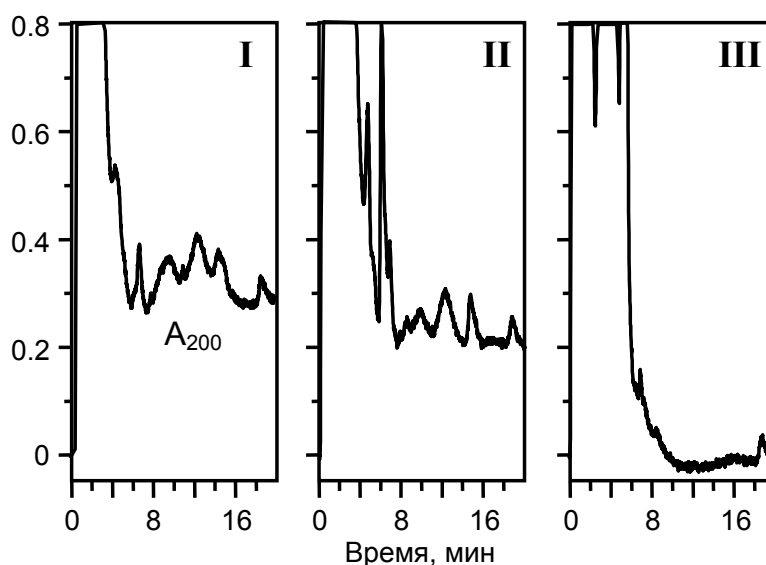


Рис. 10. Хроматограммы сыворотки при различных способах обработки пробы.
 I - без обработки гексаном; II – после экстракции гексаном, pH 7;
 III – после экстракции гексаном, pH 2.

Колонка: $\varnothing 2 \times 75$ мм, Нуклеосил 100-5 C18.

Элюенты: А- 0.2 М $\text{LiClO}_4 - \text{H}_3\text{PO}_4$, pH 3; Б – MeCN.

Линейный градиент: 2500 мкл от 50% до 80% Б; 1000 мкл 80% Б.

Скорость потока: 150 мкл/мин. **Температура:** 70°C. **УФ-детектор:** $\lambda = 200$ нм.

Проба: 100 мкл обработанной сыворотки крови.

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. К сожалению, такая обработка пробы невозможна для всех определяемых соединений, в то время как удаление свободных и слабосвязанных нейтральных липидов можно использовать во всех случаях. В таблице 8 приведены эффективность и величина давления на входе колонки и разрешение для двух соединений тестового раствора в зависимости от числа анализов, выполненных на этой колонке. Число анализов, приведенное в левом столбце таблицы, указано для определения ПСП, где объем пробы составляет, чаще всего, 5 мкл (2,5 мкл сыворотки). При определении метотрексата, когда объем пробы составляет 5-20 мкл и число проб будет меньше, мы привели еще и общий объем сыворотки.

Таблица 8. Эффективность, давление на входе в колонку и разрешение.

Число анализов (Объем сыворотки, мкл)	Эффективность, т.т.		Макс. давление на входе в колонку*, МПа	R_S^* пиков фенантрен/ антрацен
	После анализов	После хране- ния в MeCN (12 час.)		
0		4220	5,1	1,47
100 (250)	3690	4150	5,1	1,46
200 (500)	3480	-	-	-
300 (750)	2770	3820	5,5	1,45
400 (1000)	3370	3860	5,6	1,43

*) - Величины приведены для колонки после хранения ее в MeCN.

Эффективность колонки, измеренная сразу после проведения анализов, существенно ниже, чем эта же величина, измеренная после выдерживания колонки в ацетонитриле в течение 12 часов. Мы считаем, что это явление может быть связано с сорбцией мицеллярных структур пробы, которые прочно удерживаются на ОФ сорбенте. Сорбция таких структур снижает емкость сорбента, вследствие чего снижается эффективность колонки.

В процессе хранения сорбента в органическом растворителе сорбированные мицеллы пробы медленно разрушаются. Компоненты этих мицелл, удерживающиеся гораздо слабее, элюируются из колонки, эффективность которой опять возрастает. Это явление имеет большее практическое значение. Обычно после проведения анализов рекомендуется в течение длительного времени промывать колонку "сильной" ПФ, что приводит к большому расходу дорогостоящих растворителей и не дает нужного результата, т.к. процесс разрушения сорбированных структур достаточно медленный.

Незначительное изменение максимального давления на входе в колонку и разрешения пары "фенантрен/антрацен" после проведения 400 анализов также свидетельствуют о стабильности хроматографической колонки. Таким образом, предварительная обработка сыворотки крови гексаном, удаляющая наиболее гидрофобные липиды, в сочетании с хранением в ацетонитриле позволяет заметно увеличить длительность эксплуатации колонки.

4.5.2. Осаждение белков.

Осаждение белков является довольно распространенным методом подготовки пробы в ТЛМ. Наиболее часто для осаждения белка используется ацетонитрил при различных соотношениях ацетонитрил-сыворотка. В нашей работе мы выбрали соотношение 1:1 [122], так как при изменении соотношения до 2:1 степень осаждения белка возрастает незначительно: с 92 до 97% [65]. Уменьшение соотношения ацетонитрил-сыворотка ведет к меньшему разбавлению пробы и позволяет вводить пробу из растворителя с более высокой полярностью, что обеспечивает приемлемую 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 9. Консистенция* образующегося осадка белков сыворотки в зависимости от концентрации перхлората лития в ацетонитриле.

Концентрация LiClO ₄ в пробе, М	Консистенция* осадка
0.5	Плотный
0.4	Плотный
0.3	Плотный
0.2	Рыхлый
0.1	Рыхлый

*) Консистенция осадка оценивалась визуально по прозрачности супернатанта при легком встряхивании пробирки после центрифугирования.

4.5.3. Подготовка пробы для определения этосуксимида.

Этосуксимид – гидрофильное соединение, слабо удерживающееся на обращенной фазе. Для таких соединений эффективность разделения на колонке с ОФ сильно зависит от содержания ацетонитрила в инжектируемой пробе и от объема вводимой пробы. На рис. 10 приведены зависимости высоты пика этосуксимида от объема пробы (для кривых 1 и 2 растворитель содержит 50% ацетонитрила). При

инъекции пробы из 50% ацетонитрила объем вводимой пробы не может превышать 2 мкл без значительного снижения эффективности по пику этосуксимида.

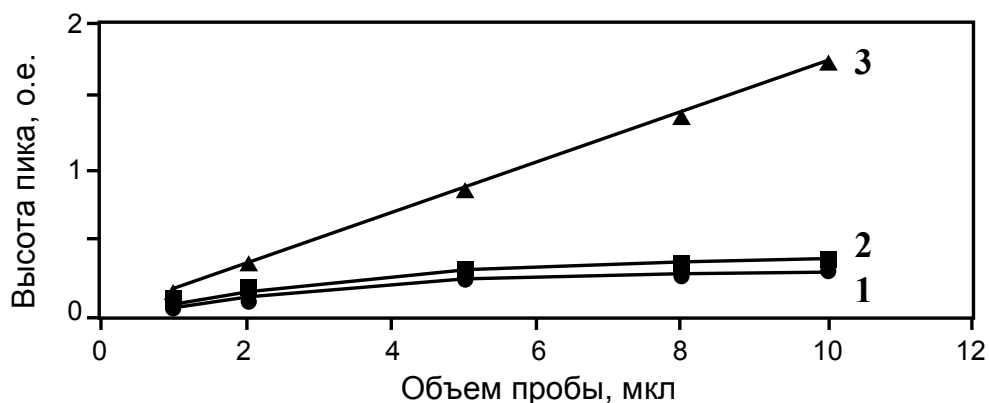


Рис. 10. Зависимость высоты пика этосуксимида от объема вводимой пробы.

- 1- растворитель – 50% MeCN
- 2- растворитель – 50% MeCN, 5 мкл предпробы (0,2 М LiClO₄, pH 3);
- 3- растворитель – обработанная сыворотка после удаления MeCN.

Инъекция пробы с предпробой (кривая 2), когда в инъекционную иглу перед набором раствора образца набирают воду (или буферный раствор) для разбавления растворителя образца, практически не влияет на эффективность по пику этосуксимида и предел количественного определения для этосуксимида по данной методике составляет 3,3 мкг/мл. При необходимости определения более низких концентраций этосуксимида можно использовать такой простой прием, как удаление ацетонитрила из супернатанта экстракцией хлористым метиленом, который позволяет вводить пробы не менее 10 мкл без снижения эффективности разделения (кривая 3). Такой прием, использующийся при определении гидрофильных соединений, в данном случае позволяет повысить чувствительность анализа в 10 раз. Кроме этого, он позволяет продлить "время жизни" колонки вследствие удаления липидных компонентов пробы [68].

4.5.4. Подготовка пробы для определения клоназепама.

Терапевтическая концентрация клоназепама в сыворотке крови составляет 40-70 нг/мл и его определение требует стадии предварительного концентрирования. Для извлечения этого препарата из сыворотки крови чаще всего используют жидко-жидкостную [70, 123, 124], реже – твердофазную экстракцию [125] или метод сочетания колонок [126].

Степень извлечения клоназепама (50 нг/мл) из сыворотки крови в при двукратной экстракции и соотношении сыворотка:экстрагент=1:1 составила в среднем 99% (n=5), что согласуется с данными авторов [70], которые используют однократную экстракцию при соотношении фаз сыворотка:экстрагент=1:10 и степень извлечения клоназепама при этом составила примерно 101%.

Клоназепам часто назначается в сочетании с карбамазепином, терапевтическая концентрация которого в 100-500 раз превышает концентрацию клоназепама – 6-12 мкг/мл. Эти препараты обладают сходными физико-химическими свойствами и разделить их на стадии подготовки пробы не удастся. Извлечение карбамазепина составило около 85% (n=5).

4.5.5. Подготовка пробы для определения циклоспорина А.

Терапевтическая концентрация циклоспорина А в сыворотке крови составляет 100-400 нг/мл. Определение этого соединения обычно проводится после стадии концентрирования с применением жидко-жидкостной [116, 118] или твердофазной [117, 119] экстракции.

Извлечение циклоспорина А из сыворотки крови мы выполняли экстракцией хлористым метиленом. Степень извлечения циклоспорина А (500 нг/мл) из сыворотки крови составила в среднем 89% (n=5). Обработка пробы гексаном в кислой среде, предложенная авторами [22], позволяет удалить большую часть УФ-поглощающих соединений, мешающих определению циклоспорина А.

4.5.6. Подготовка пробы для определения вальпроевой кислоты.

Терапевтическая концентрация вальпроевой кислоты в сыворотке крови находится в интервале 50-100 мкг/мл и это соединение практически не поглощает свет в УФ-области спектра. Известны отдельные работы, предполагающие определение этого препарата в недериватизованном состоянии, но в ТЛМ такой метод определения вальпроевой кислоты не используется. Чаще всего она определяется в виде эфира с *para*-бромфенацилбромистым [103] или 4-бромметил-7-метоксикумарином [104].

Мы определяли вальпроевую кислоту в виде *para*-бромфенацилового эфира. На рис. 11 представлена схема реакции получения *para*-бромфенацилового эфира вальпроевой кислоты, а на рис. 12 приведена зависимость площади пика образующегося эфира от времени.

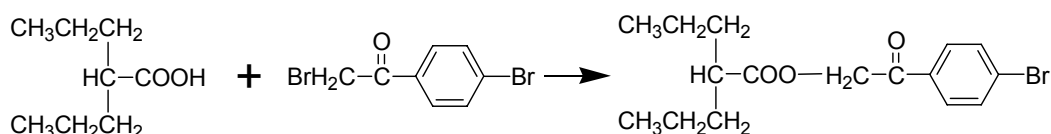


Рис. 11. Реакция получения *n*-бромфенацилового эфира вальпроевой кислоты.

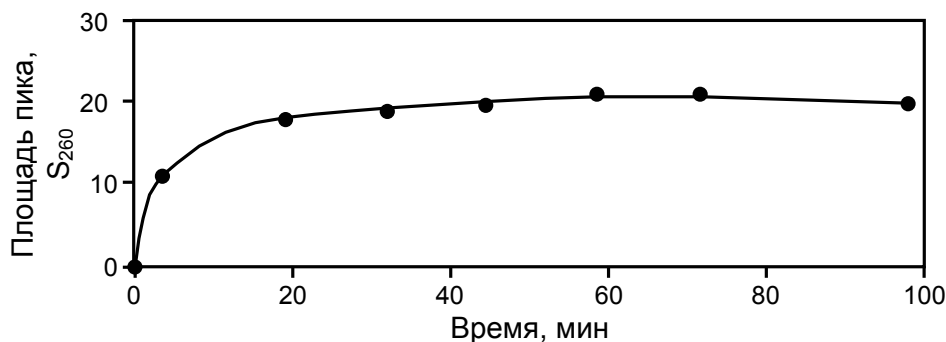


Рис. 12. Зависимость площади пика (при $\lambda=260$ нм) образующегося *n*-бромфенацилового эфира вальпроевой кислоты от времени. Начальная концентрация вальпроевой кислоты 70 мкг/мл. Объем пробы 5 мкл.

Как видно из рис. 12, время реакции 1 час при комнатной температуре является достаточным для проведения реакции. Степень извлечения вальпроевой кислоты из сыворотки крови (50 мкг/мл) гексаном (в присутствии 2М H_3PO_4) составила, в среднем, 60% ($n=5$).

4.6. Определение ПСП в сыворотке крови.

В данной работе предложены унифицированные хроматографические условия, позволяющие определять этосуксимид, гексамидин, фенобарбитал, ламиктал, дифенин, карбамазепин, бензонал, клоназепам и вальпроевую кислоту как в случае моно-, так и в случае комплексной терапии в любых сочетаниях. На рис. 13 приведена типичная хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента, принимающего лечение этосуксимидом.

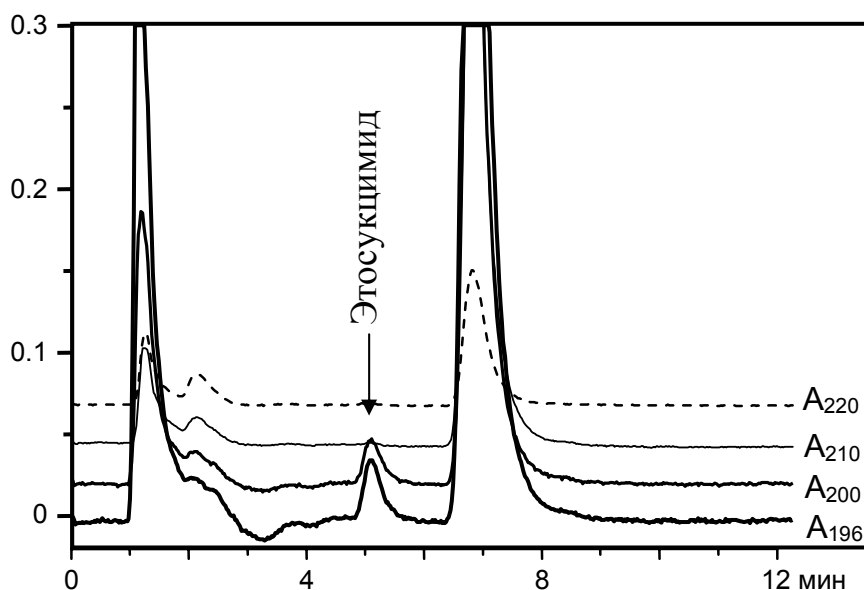


Рис. 13. Определение этосуксимида в сыворотке крови. Концентрация этосуксимида в исходной сыворотке 28 ± 2 мкг/мл.

Колонка: 2 x 75 мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - H₃PO₄, pH 3; **Элюент Б:** MeCN

Подвижная фаза: 10% Б

Скорость потока: 150 мкл/мин **Температура:** 40°C

Детектор: 196, 200, 210, 220 нм

Проба: обработанная сыворотка крови **Объем пробы:** 2 мкл

На рис. 14 приведены типичные хроматограммы обработанной сыворотки крови пациентов, проходящих лечение в фенобарбиталом или бензоналом. (Бензонал – производное фенобарбитала – быстро метаболизируется в организме пациента в фенобарбитал и мониторинг ведется по концентрации фенобарбитала). На рис.14 (I) – хроматограмма холостой пробы (обработанная сыворотка крови пациента, не принимающего фенобарбитал); 14 (II) – концентрация фенобарбитала

в исходной сыворотке ниже терапевтической (5,8 мкг/мл); 14 (III) – в пределах терапевтического интервала (22 мкг/мл); 14 (IV) – выше терапевтической (33 мкг/мл).

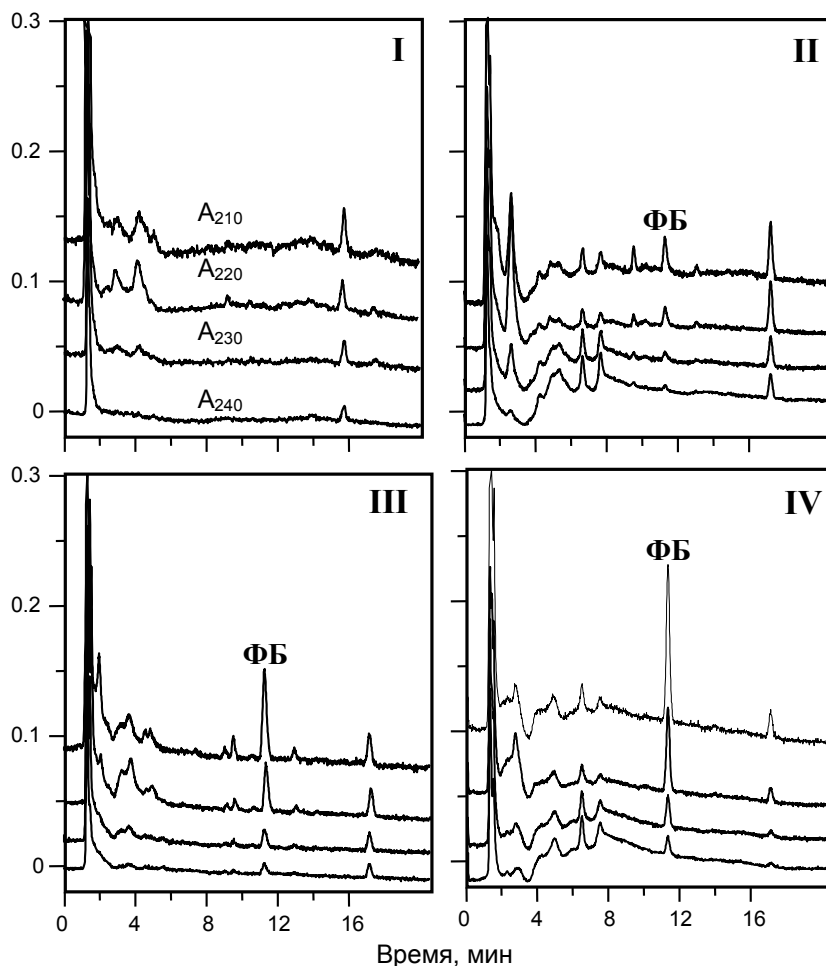


Рис. 14. Определение фенобарбитала (ФБ) в сыворотке крови.

I – холостая проба; II – концентрация ФБ 5,8 мкг/мл;

III - концентрация ФБ 22 мкг/мл; IV концентрация ФБ 33 мкг/мл.

Колонка: 2 x 75 мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - Н₃РО₄, рН 3; **Элюент Б:** MeCN

Градиент: Линейный; 2000 мкл от 10%Б до 30%Б, 1000 мкл 30%Б

Скорость потока: 150 мкл/мин **Температура:** 40°C

УФ-детектор: 210, 220, 230, 240 нм

Проба: обработанная сыворотка крови **Объем пробы:** 5 мкл

На рис. 15-I приведена хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента, проходящего лечение финлепсином (действующее вещество – карбамазепин). Мы видим, что на всех приведенных хроматограммах пики определяемых соединений симметричны и полностью отделены от эндогенных

компонентов сыворотки. Идентификацию пиков определяемых соединений выполняли сравнением времен удерживания и спектральных отношений с соответствующими параметрами хроматограмм стандартных растворов. Во всем интервале терапевтических концентраций для всех определяемых соединений значения спектральных отношений совпадали в пределах ошибки с соответствующими значениями спектральных отношений стандартных растворов, что означает гомогенность пиков.

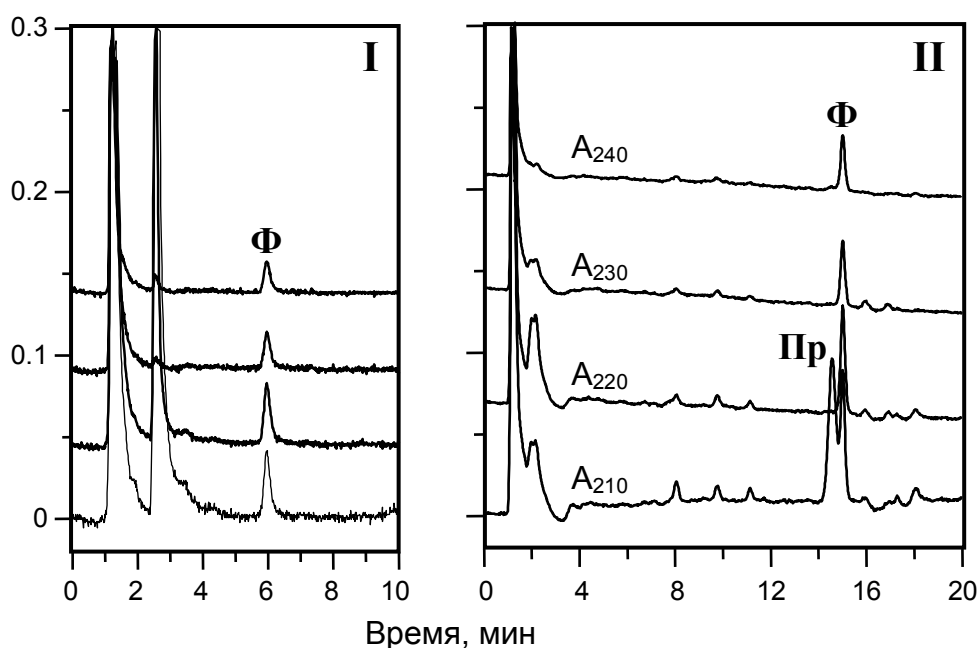


Рис. 15. Определение финлепсина (Ф) в сыворотке крови.
Ф – финлепсин; Пр – неидентифицированная примесь.

Колонка: 2 x 75 мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - Н₃РO₄, рН 3; **Элюент Б:** MeCN

Подвижные фазы:

I - 30%Б; **II** - линейный градиент: 2000 мкл от 10%Б до 30%Б, 1000 мкл 30% Б

Скорость потока: 150 мкл/мин **Температура:** 40°C

УФ-детектор: 210, 220, 230, 240 нм

Проба: обработанная сыворотка крови **Объем пробы:** 5 мкл

На рис.15 (II) приведена хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента, проходящего лечение финлепсином. Пик Ф - финлепсин, пик Пр - неидентифицированная примесь, обладающая поглощением на длине волны $\lambda = 210$ нм и полностью не отделяющаяся от пика финлепсина в данных хроматографических условиях. Используя детекцию при длине волны 220, 230 или

240 нм, где неидентифицированная примесь не поглощает и значения спектральных отношений стандартного раствора финлепсина, можно рассчитать площадь пика, соответствующую $\lambda = 210$ нм. Таким образом, применение одновременной многоволновой фотометрической детекции позволяет рассчитать концентрацию финлепсина в данной пробе без изменения условий хроматографического определения.

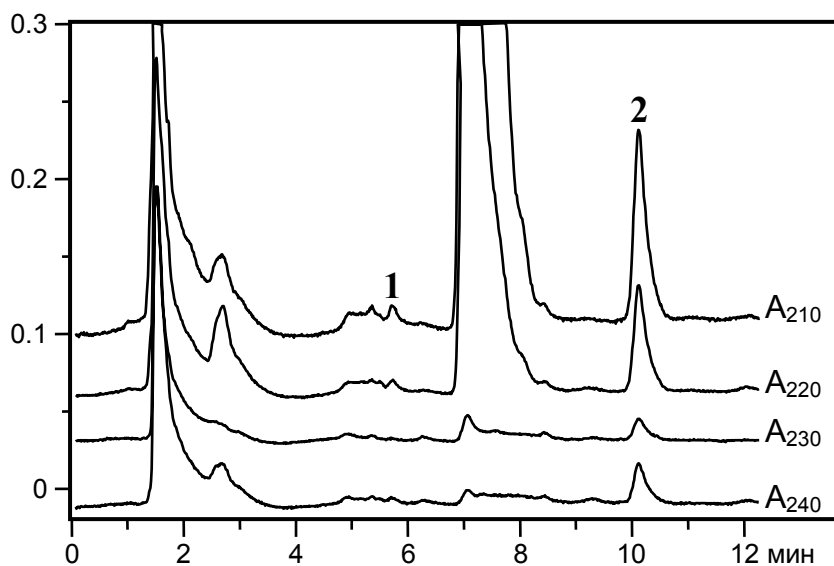


Рис. 16. Хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента, принимающего лечение гексамидином.

1 – гексамидин ($2,9 \pm 0,2$ мкг/мл); 2 - фенобарбитал (36 ± 2 мкг/мл).

Колонка: 2 x 75 мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - Н₃РO₄, рН 3; **Элюент Б:** MeCN

Градиент: Линейный; 2000 мкл от 10%Б до 30%Б, 1000 мкл 30%Б

Скорость потока: 150 мкл/мин **Температура:** 40°C

УФ-детектор: 210, 220, 230, 240 нм

Проба: обработанная сыворотка крови **Объем пробы:** 5 мкл

На рис. 16 приведена хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента, проходящего лечение гексамидином. В организме пациента гексамидин медленно метаболизируется 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. Хроматографические методы позволяют одновременное определение как

исходного гексамидина так и его активного метаболита фенобарбитала [100, 101, 108]. Применение градиентного элюирования позволяет одновременно определить оба этих соединения без существенного увеличения длительности анализа.

На рис. 17 и 18 приведены хроматограммы обработанных сывороток крови пациентов при комплексной терапии. Предлагаемые в данной работе условия позволяют определять любые сочетания УФ-поглощающих ПЭП, используемых при проведении комплексного лечения.

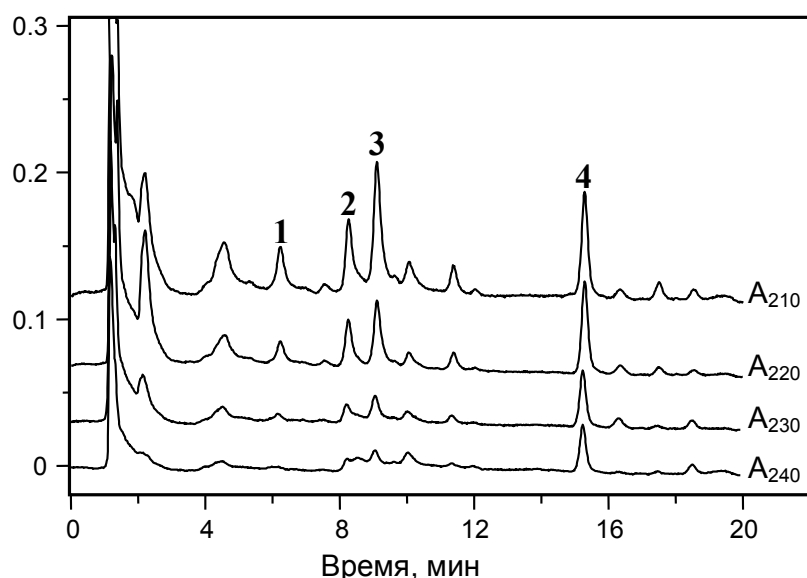


Рис. 17. Хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента в случае комплексной терапии. Суточная доза:

гексамидин - 400 мг, ламиктал - 50 мг, карбамазепин - 600 мг.

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

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

Колонка: 2 x 75 мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - H₃PO₄, pH 3; **Элюент Б:** MeCN

Градиент: Линейный; 2000 мкл от 10%Б до 30%Б, 1000 мкл 30%Б

Скорость потока: 150 мкл/мин **Температура:** 55°C

УФ-детектор: 210, 220, 230, 240 нм

Проба: обработанная сыворотка крови **Объем пробы:** 5 мкл

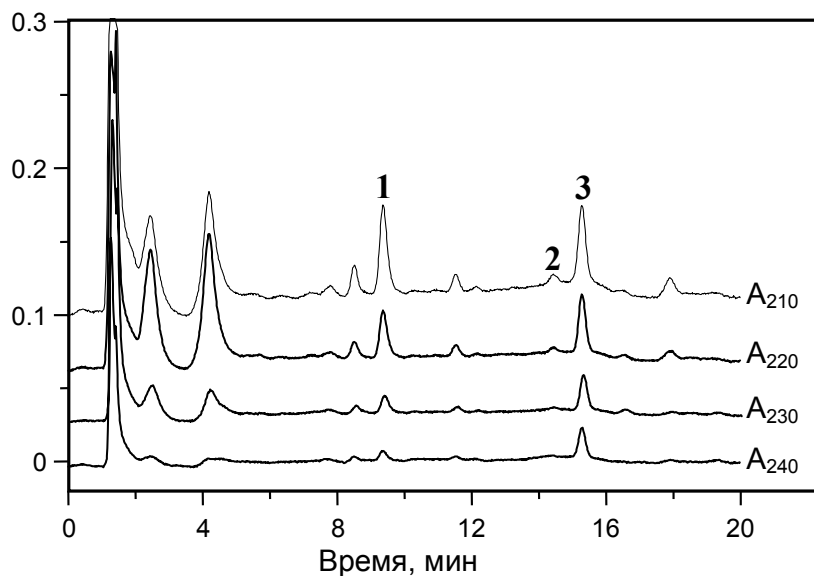


Рис. 18. Хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента в случае комплексной терапии. Суточная доза:
 фенобарбитал - 100 мг, дифенин - 100 мг, карбамазепин - 1000 мг.
 1 – фенобарбитал (19 ± 1 мкг/мл); 2 – дифенин ($1,9 \pm 0,2$ мкг/мл);
 3 – карбамазепин ($7,4 \pm 0,4$ мкг/мл).

Колонка: 2 x 75 мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - Н₃РO₄, рН 3; **Элюент Б:** MeCN

Градиент: Линейный; 2000 мкл от 10%Б до 30%Б, 1000 мкл 30%Б

Скорость потока: 150 мкл/мин **Температура:** 55°C

УФ-детектор: 210, 220, 230, 240 нм

Проба: обработанная сыворотка крови **Объем пробы:** 5 мкл

При проведении комплексной терапии наиболее сложным является мониторинг клоназепама в присутствии карбамазепина, концентрация которого в 100-500 раз превышает концентрацию клоназепама. Для решения этой проблемы используют ПФ, содержащие добавки алкиламинов, присутствие которых подавляет взаимодействие карбамазепина с силанольными группами сорбента, либо используют специальные фазы, практически не содержащие открытые силанольные группы [70]. Оба этих приема позволяют хроматографировать карбамазепин в виде "узкого" пика.

На рис. 19 (I) приведена хроматограмма экстракта стандартного раствора клоназепама в присутствии карбамазепина. Концентрация карбамазепина в исходном стандартном растворе составляла 12 мкг/мл (максимальная

терапевтическая концентрация), а клоназепам – 120 нг/мл. В данных условиях пик карбамазепина симметричен (несколько повышенное значение $A_{10\%}=1,38$ связано в данном случае с перегрузкой колонки по карбамазепину) и степень разделения карбамазепин/клоназепам даже при максимальной ширине пика карбамазепина равна 2,06 (при $\lambda = 310$ нм). Такое разрешение свидетельствует о разделении этих двух соединений до нулевой линии даже при максимально возможной концентрации карбамазепина в исходной сыворотке. На рис. 19 (I) приведена хроматограмма экстракта сыворотки крови пациента, проходящего лечение карбамазепином (600 мг/сутки) и клоназепамом (2 мг/сутки); на рис. 19 (II) – хроматограмма экстракта сыворотки крови пациента, не принимающего карбамазепин и клоназепам.

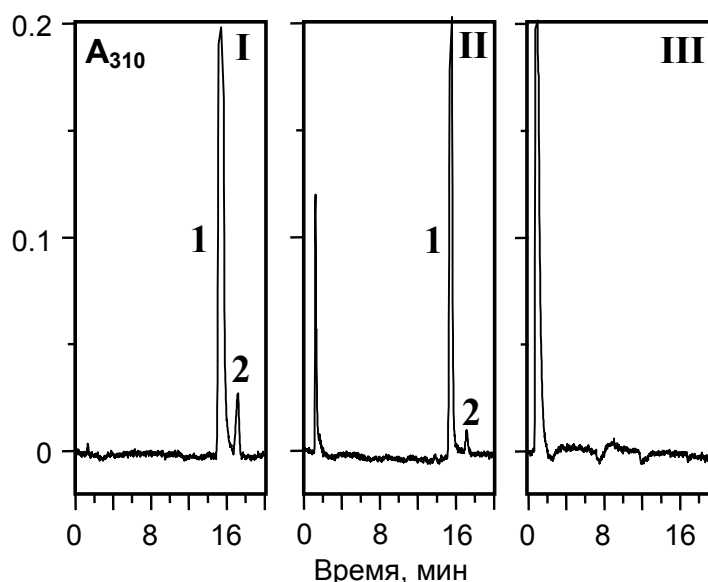


Рис. 19. Определение клоназепам в сыворотке крови.

I- хроматограмма экстракта стандартного раствора;

II- и III- хроматограммы крови пациентов, принимающего и не принимающего карбамазепин и клоназепам.

1 - карбамазепин ($6,4 \pm 0,4$ мкг/мл); 2 - клоназепам (25 ± 5 нг/мл).

Колонка: 2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18.

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - H₃PO₄, pH 3; **Элюент Б:** MeCN.

Градиент: Линейный; 2000 мкл от 10%Б до 30%Б, 1000 мкл 30%Б.

Скорость потока: 150 мкл/мин. **Температура:** 40°C.

УФ-детектор: 310, 320, 330, 340 нм.

Объем пробы: 20 мкл.

Пик клоназепама на хроматограмме экстракта сыворотки симметричен и спектральные отношения совпадают в пределах ошибки со спектральными отношениями стандартного раствора:

Соединение	Спектральные отношения, R		
	S_{320}/S_{310}	S_{330}/S_{310}	S_{340}/S_{310}
Клоназепам (проба)	0,918	0,748	0,458
Клоназепам (стандарт)	0,921	0,725	0,462

На рис. 20 приведена хроматограмма экстракта вальпроевой кислоты (ВК) после получения *n*-бромфенацилового эфира. Пик производного симметричен и полностью отделен от эндогенных соединений сыворотки.

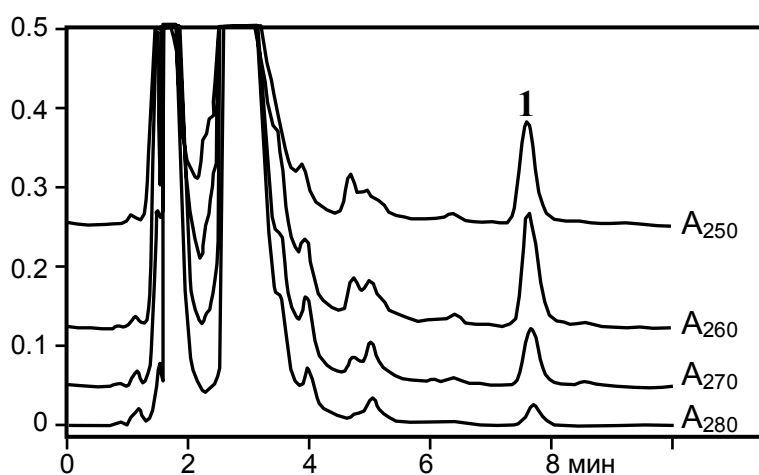


Рис. 20. Определение вальпроевой кислоты в экстракте сыворотки крови в виде *n*-бромфенацилового эфира (1).

1 - *n*-бромфенациловый эфир ВК. Концентрация ВК в сыворотке 67 ± 8 мкг/мл.

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

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - H₃PO₄, pH 3; **Элюент Б:** MeCN.

Подвижная фаза: 65%Б.

Скорость потока: 150 мкл/мин **Температура:** 40°C.

УФ-детектор: 250, 260, 270, 280 нм. **Объем пробы:** 5 мкл

Все разработанные методики были использованы для определения концентрации ПСП в сыворотке крови пациентов, проходящих лечение в Иркутской Государственной Областной детской клинической больнице. Было

проанализировано более 700 проб сыворотки крови (см. Приложение 4). 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.

4.7. Определение циклоспорина А в сыворотке крови.

На рис. 21 приведена хроматограмма обработанной сыворотки крови пациента, проходящего лечение циклоспорином А.

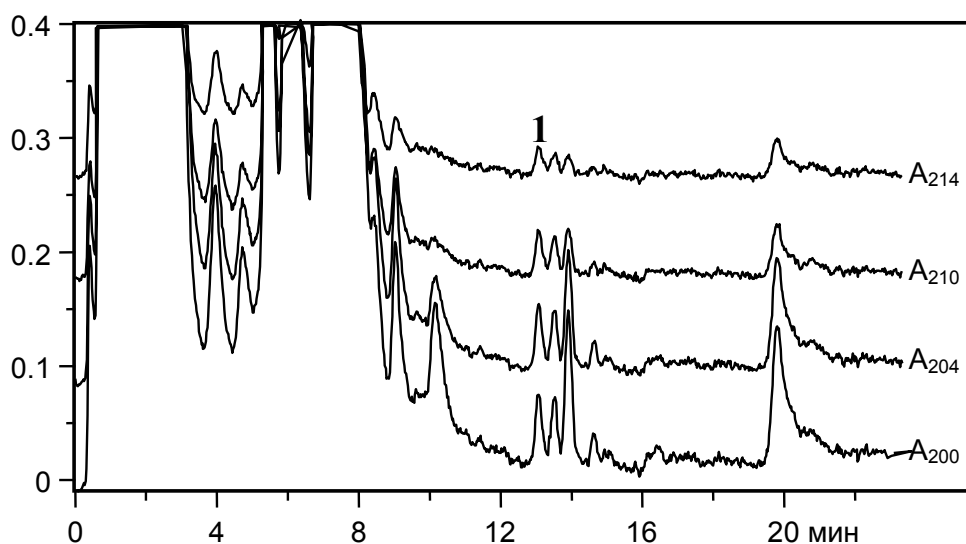


Рис. 20. Хроматограмма экстракта сыворотки крови пациента, принимающего циклоспорин А (200 мг/сутки).

Концентрация циклоспорина А в исходной сыворотке составляет 98 ± 10 мкг/мл.

Колонка: 2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18.

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - Н₃РO₄, рН 3; **Элюент Б:** MeCN.

Градиент: Линейный, 2500 мкл от 50%Б до 80%Б, 1000 мкл 80%Б.

Скорость потока: 150 мкл/мин. **Температура:** 70°C.

УФ-детектор: 200, 204, 210, 214 нм.

Объем пробы: 100 мкл.

Пик циклоспорина А симметричен, несмотря на большой объем инжектируемой пробы (растворитель - 50% ацетонитрил) и полностью отделен от сопутствующих компонентов. Совпадение в пределах ошибки спектральных отношений пика циклоспорина А в экстракте сыворотки крови со спектральными отношениями пика стандартного раствора свидетельствуют о гомогенности пика определяемого соединения:

Соединение	Спектральные отношения, R		
	S_{204}/S_{200}	S_{210}/S_{200}	S_{214}/S_{200}
Циклоспорин А (проба)	0,918	0,626	0,500
Циклоспорин А (стандарт)	0,938	0,658	0,566

Методика использована для определения циклоспорина А в сыворотке (плазме) крови детей, проходящих лечение в Иркутской Государственной Областной детской клинической больнице. Было проанализировано 4 образца. Концентрация циклоспорина А в сыворотке во всех исследованных образцах находилась в интервале терапевтических концентраций.

4.8. Определение метотрексата в сыворотке крови.

На рис 21 приведены хроматограммы обработанной сыворотки крови пациентов, проходящих лечение высокими дозами метотрексата. Рис. 21 (I) и 21 (II) - пробы крови отобраны в процессе инфузии препарата (где концентрация метотрексата достаточно высока и для данных образцов составляет 1,2 и 0,7 мкМ, соответственно). Рис. 21(III) - концентрация метотрексата в исходной сыворотке составляет 0,2 мкМ (проба крови отобрана через 2 часа после окончания инфузии). Рис. 21(IV) – концентрация МТХ менее 0,001 мкМ (через 18 часов после окончания инфузии). На всех хроматограммах пики МТХ симметричны и полностью отделены от эндогенных соединений сыворотки крови. Детектирование на длине волны 300 нм (второй максимум) значительно снижает число УФ-поглощающих (мешающих) компонентов сыворотки при достаточной чувствительности по определяемому компоненту.

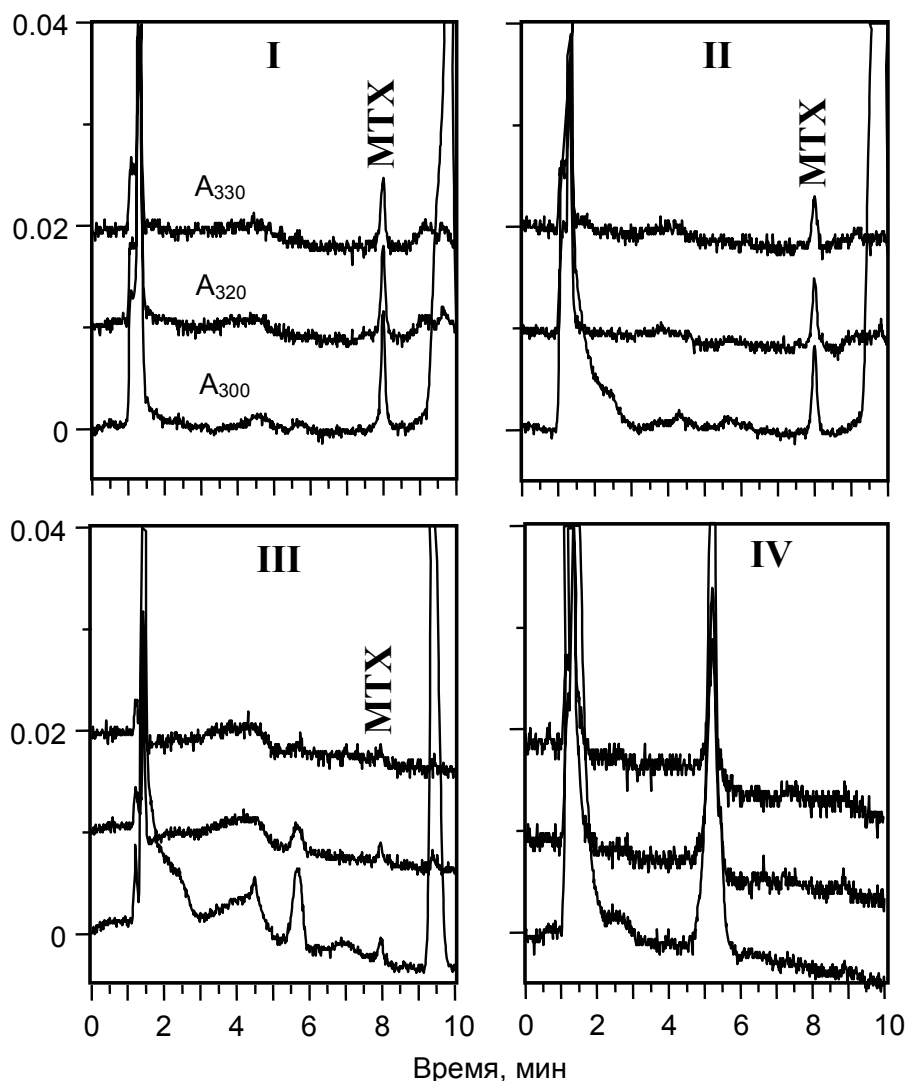


Рис. 21. Хроматограммы обработанной сыворотки крови пациентов, проходящих лечение высокими дозами метотрексата (MTX).

Колонка: 2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18.

Элюент А: 0.2 М LiClO₄ - Н₃РO₄, рН 3; **Элюент Б:** АСN.

Градиент: Линейный; 2200 мкл от 5%Б до 20%Б, 1000 мкл 20% Б.

Скорость потока: 150 мкл/мин. **Температура:** 40°С.

УФ-детектор: 280, 300, 310, 320 нм.

Проба: обработанная сыворотка крови.

Объем пробы: 20 мкл.

Методика использована для определения концентрации МТХ в сыворотке крови детей, получающих лечение высокими дозами препарата. Лечение проводится в четыре приема с перерывами в две недели и заключается во внутривенном введении раствора МТХ в течение 36 часов. МТХ является сильнейшим системным ядом, поэтому через 6, 12, а при необходимости еще через

18 и 24 часа после окончания инфузии МТХ ребенку вводится противоядие – лейковорин.

Концентрация метотрексата в крови разных пациентов в процессе введения существенно различается, несмотря на то, что дети получают одинаковую “стандартную” дозу препарата – 1000 мг на 1 м² поверхности тела. Различается также и скорость выведения метотрексата по окончании инфузии. Высокая концентрация метотрексата и (или) низкая скорость выведения препарата связаны с осложнениями - воспалением десен и отмиранием их тканей, повышением температуры, тошнотой, рвотой, поражениями кожи, а в некоторых случаях – с тяжелыми поражениями печени, почек, сердца, что может приводить к гибели детей.

Мониторинг концентрации МТХ в сыворотке крови выполнялся при проведении первой (из четырех) инфузии, для которой доза МТХ определялась из расчета 1000 мг/м² поверхности тела ребенка.

На рис. 22 приведена зависимость концентрации МТХ от времени в образцах крови пациента, проходящего лечение МТХ по стандартной схеме (1000 мг/м²). 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 выведения препарата из организма ребенка. Тем, не менее, концентрация 0,1 мкМ высока и определяется высокой концентрацией МТХ в процессе инфузии, которая, в свою очередь, зависит от дозы вводимого препарата. Токсичность МТХ связана, в основном, с длительностью его воздействия, поэтому ребенку был дополнительно введен лейковорин (антидот МТХ). При проведении последующих инфузий доза МТХ была снижена до 900 мг/м². Ранее было отмечено, что при снижении дозы на 10 % концентрация МТХ в крови пациента 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 0,001 мкМ.

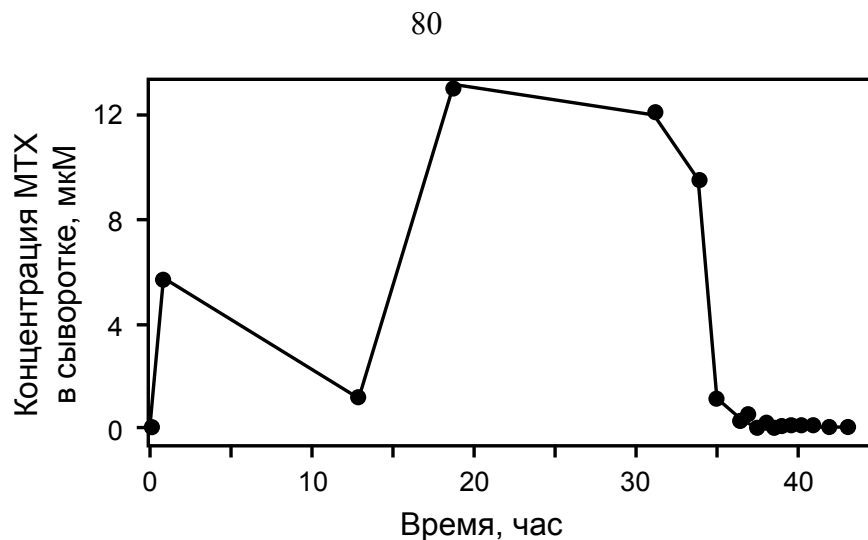


Рис. 22. Изменение концентрации МТХ в сыворотке крови пациента в процессе лечения высокими дозами МТХ.

По разработанной методике был проведен мониторинг 30 пациентов онкогематологического отделения Областной Государственной детской клинической больницы г. Иркутска, проходящих лечение высокими дозами МТХ. Отмечено, что около 75% пациентов нуждаются в изменении "стандартной" схемы лечения.

Результаты ВЭЖХ-анализа в сочетании с клиническими данными использованы для изменения схемы дальнейшего лечения: для пациентов, имеющих высокие содержания МТХ в образцах крови в процессе инфузии, рекомендовано уменьшить дозу вводимого препарата на 5-10%; при низкой скорости выведения МТХ после окончания инфузии рекомендовано трижды вводить лейковорин, через каждые 6 часов. Отмечено, что при дальнейшем лечении по измененной схеме осложнений не было.

На рис. 23 приведена гистограмма, показывающая максимальную найденную концентрацию МТХ в крови в процессе инфузии для некоторых пациентов.

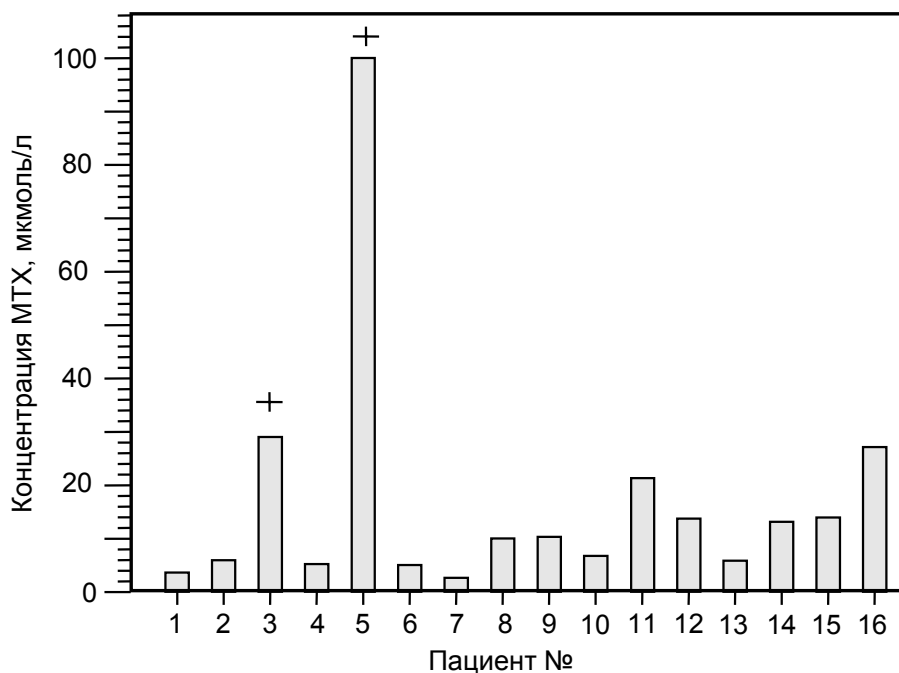


Рис. 23. Максимальная найденная концентрация МТХ в крови пациентов (по данным ВЭЖХ) в процессе инфузии. Больные 3 и 5 умерли.

4.9. Метрологические характеристики разработанных методик.

4.9.1. Предел обнаружения, предел количественного определения и линейный диапазон.

В табл. 10 приведены значения предела обнаружения и предела количественного определения для всех определяемых соединений. В УФ-ВЭЖХ обе эти величины зависят от параметров хроматографической системы (см. Главу 2). В данном случае эти величины рассчитаны для хроматографической колонки, эффективность которой составляет 3000 т.т. и которая достаточна для решения большинства задач рутинного анализа. Уровень шума при 196, 200 и 210 нм составлял $\sim 0,001$ е.о.п.; при 300 и 310 нм - $\sim 0,0005$ е.о.п. Пределы обнаружения указаны с соблюдением условия, что относительное стандартное отклонение ($S_{\text{восп.}}$) и отклонение от номинального значения не превышают 20%, а пределы количественного определения – 15%. (Эти критерии являются общепринятыми для биоаналитических методик).

Значение предела обнаружения для вальпроевой кислоты, приведенное в табл. 10 – 7 мкг/мл – в 1,4 раза превышает значение $S/N=3$, принятого для его оценки (при соблюдении этого условия $\text{PrO}_{\text{ВК}}$ должен быть 5 мкг/мл). Это связано

с тем, что при концентрации вальпроевой кислоты в сыворотке крови 5 мкг/мл относительное стандартное отклонение метода превышает 20%. Причиной этого в данном случае может быть низкая степень извлечения вальпроевой кислоты из сыворотки крови (в среднем 60 %).

Приведенные значения пределов количественного определения показывают, что определение данных соединений возможно во всем интервале терапевтических концентраций. При необходимости некоторое повышение чувствительности возможно при увеличении объема инжектируемой пробы.

В табл. 10 приведена верхняя граница линейного диапазона для всех определяемых соединений при указанных в таблице длинах волн детектирования и объемах инжектируемых образцов.

При определении в сыворотке крови этосуксимида, гексамидина, фенобарбитала (бензонала), ламиктала, дифенина, карбамазепина и метотрексата в качестве верхней границы динамического линейного диапазона была выбрана концентрация 100 или 200 мкг/мл (10^{-3} - 10^{-4} Моль/л) по каждому соединению в исходной сыворотке.

Для определения в сыворотке крови циклоспорина А и клоназепама верхняя граница линейного диапазона указана с учетом стадии экстракции, а для определения вальпроевой кислоты – с учетом стадий экстракции и дериватизации. Подтверждением линейной зависимости между концентрацией определяемого соединения в сыворотке и площадью пика этого соединения (или его производного для вальпроевой кислоты) в хроматографируемом образце могут быть коэффициенты корреляции градуировочных зависимостей для всех определяемых соединений в выбранном диапазоне концентраций (5 концентраций, $n=10$ для каждой концентрации), которые были не хуже 0,98. Таким образом, для всех определяемых соединений подтверждена линейная зависимость "концентрация в исходной сыворотке крови – площадь пика в инжектируемом растворе" в интервале ПрО – верхняя граница линейного диапазона. Для всех определяемых соединений линейный интервал шире интервала терапевтических концентраций.

Таблица 10. Линейный диапазон, предел детектирования и предел количественного определения.

Определяемое соединение	Объем пробы, мкл	Длина волны определения, нм	Предел детектирования, мкг/мл (S/N=3)	Предел количественного определения, мкг/мл (S/N=10)	Верхняя граница линейного диапазона, мкг/мл	Терапевтическая концентрация, мкг/мл [2]
Вальпроевая к-та	5	260	7	15	200	40-100
Гексамидин	5	210	1,3	4,3	200	5-12
Дифенин	5	210	1,0	3,3	200	5-20
Карбамазепин	5	210	0,35	1,2	200	2-12
Клоназепам	30	310	0,003	0,01	2	0,01-0,08
Ламиктал	10	210	0,15	0,5	100	(0,5) 1-3 (12)**
Фенобарбитал	5	210	0,75	2,5	200	10-40
Этосуксимид	2	196	1	3,3	200	30-100
Метотрексат	20	300	0,02	0,07	100	0,23
Циклоспорин А	100	200	0,01	0,03	5	0,1-0,4

4.9.2. Оценивание характеристики воспроизводимости.

Воспроизводимость результатов определения содержания этосуксимида, гексамидина, фенобарбитала (бензонала), ламиктала, дифенина, карбамазепина и метотрексата в сыворотке крови оценивали по данным анализа реальных проб. Образец сыворотки крови, содержащий исследуемое соединение, делили на 10 частей и замораживали при -20°C .

Оценивание характеристики воспроизводимости определения вальпроевой кислоты, циклоспорина А и клоназепама в сыворотке крови готовили искусственные образцы на основе донорской сыворотки крови. Для их приготовления в образец донорской сыворотки крови вносили рассчитанное количество изучаемого ЛВ, перемешивали, образец делили на 10 частей и замораживали при -20°C .

Для оценивания характеристики воспроизводимости образцы обрабатывали и проводили хроматографическое определение в соответствии с прописью методики в условиях воспроизводимости (разное время). Характеристики погрешности результатов ВЭЖХ-анализа оценивались в соответствии с Рекомендацией "Характеристики погрешности результатов количественного химического анализа. Алгоритмы оценивания" МИ 2336-95 [127].

Относительное стандартное отклонение ($S_{\text{воспр.}}$) для определения этих соединений в сыворотке крови по разработанным методикам ($\alpha=0,05$, $n=10$) приведено в таблице 11.

4.9.3. Оценивание правильности.

Для оценки систематической составляющей погрешности разработанных методик был использован метод добавок. Для проверки правильности результатов анализа рабочие пробы делили на две части, в одну вводили известное количество изучаемого ЛВ в виде стандартного раствора, другую оставляли без изменений. Обе пробы независимо анализировали в соответствии с прописью методики (число параллельных определений $n=5$ для проб, содержащих этосуксимид, гексамидин, фенобарбитал (бензонал), ламиктал,

дифенин, карбамазепин и метотрексат; для проб, содержащих циклоспорин А и клоназепам n=3). Результаты приведены в табл. 12.

Таблица 11. Относительное стандартное отклонение ($S_{\text{воспр.}}$) для определения ЛВ в сыворотке крови ($\alpha=0,05$, $n=10$).

Определяемое соединение	Терапевтические концентрации, мкг/мл	Концентрация в сыворотке крови, мкг/мл	Относительное стандартное отклонение
Вальпроевая к-та	40-100	35	13,6
		60	10,1
		100	8,1
Гексамидин	5-12	5	7,2
		10	4,2
Дифенин	5-20	10	6,6
		20	4,1
Карбамазепин	2-12	4	5,2
		10	4,3
Ламиктал	0,5 (1)-3 (12)	1	6,6
		3	5,1
Фенобарбитал	10-40	10	3,6
		20	3,9
Этосуксимид	30-100	25	6,6
		50	3,8
Клоназепам	0,01-0,08	0,01	14,8
		0,02	10,2
		0,04	8,8
		0,08	7,8
Циклоспорин А	0,1-0,4	0,1	12,2
		0,2	8,1
		0,4	7,5
		0,8	6,5
Метотрексат	0,23	5-1	5,3
		1-0,2	7,2
		0,2-0,07	12,8
		0,07-0,02	19,7

Таблица 12. Контроль правильности результатов анализа образцов сыворотки крови методом добавки определяемого компонента.

Определяемое соединение	Содержание ЛВ, мкг/мл		Результат контроля, К= X-C	Отклонение, %
	Введено, (n=5)	Найдено, (n=5)		
Вальпроевая к-та	40	35,6	4,4	11
	75	68,6	6,4	8,5
Гексамидин	5	4,8	0,2	4,0
	20	18,6	1,4	7,0
Дифенин	5	5,2	0,2	4,0
	20	19,1	0,9	4,5
Карбамазепин	2	1,8	0,2	10
	10	10,6	0,6	6,0
Клоназепам*	0,03	0,026	0,004	13,3
	0,07	0,075	0,005	7,1
Ламиктал	1	0,89	0,11	11,0
	3	3,25	0,25	8,3
Фенобарбитал	5	5,2	0,2	4,0
	20	19,4	0,6	3,0
Этосуксимид	20	22,5	2,5	12,5
	50	46,3	3,7	7,4
Метотрексат	0,07	0,06	0,01	14,2
	0,2	0,21	0,01	5,0
Циклоспорин А*	0,1	0,09	0,01	10
	0,5	0,45	0,05	10

*)- число параллельных определений n=3

Результат контроля не превышает 15 %, допускаемых для биоаналитических методов при определении соединений, концентрация которых в исходной пробе выше предела количественного определения, что свидетельствует об отсутствии значимых систематических погрешностей в результатах анализа.

Таким образом, все разработанные методики удовлетворяют требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методам и могут быть использованы для ТЛМ в рутинной клинической практике.

5. ВЫВОДЫ.

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

- колонка: \varnothing 2x75 мм с сорбентом Nucleosil 100-5 C18;
- элюенты: 0,2 М перхлорат лития (рН 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, фенobarбитала, 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 (рН 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 противосудорожных препаратов у более, чем 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.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований. Приказ МЗ РФ от 21 февр. 2000 г. № 64 // Рос. газ.- 2000.-28 февр.- С. 4.
2. Regenthal R., Krueger M., Koeppel C., Preiss R. Drug levels: Therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs. // *J. Clin. Monit.* 1999. V. 15. P. 529-544.
3. Przybyciel M., Majors R.E. Phase Collapse in Reversed-Phase LC. // *LC GC Europe*, 2002. № 10. P. 2-5.
4. Nagae N., Enami T., Doshi S. The Retention Behavior of Reversed-Phase HPLC Columns with 100% Aqueous Mobile Phase. // *LC GC North America*, 2002. V. 20. № 10. P. 964-972.
5. Kobayashi S., Tanaka I., Shirota O., Kanda T., Ohtsu Y. Synthesis and characterization of a polymer-coated C₁₈ stationary phase with high carbon content for liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 828. P. 75–81.
6. Fairbank R.W.P., Wirth M.J. Role of surface-adsorbed water in the horizontal polymerization of trichlorosilanes. // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 830. P. 285–291.
7. Silva C.R., Jardim I.C.S.F., Airoidi C. Development of new urea-functionalized silica stationary phases. Characterization and chromatographic performance. // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 913. P. 65–73.
8. Layne J. Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases. // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 957. P. 149–164.
9. Kirkland J.J., Van Straten M.A., Claessens H.A. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of basic compounds at pH 11 with silica-based column packings. // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 797. P. 111–120.
10. Wilson N.S., Nelson M.D., Dolan J.W., Snyder L.R., Wolcott R.G., P.W. Carr. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. A general quantitative relationship. // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 961. P. 171–193.
11. Vervoort R.G.M., Debets A.J.J., Claessens H.A., Cramers C.A., De Jong G.J. Optimisation and characterisation of silica-based reversed-phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals. // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 897. P. 1–22.
12. Vervoort R.J.M., Derksen M.W.J., Maris F.A Selection of stationary phases for the liquid chromatographic analysis of basic compounds using chemometrical methods. // *J. Chromatogr. A.* 1994. V. 678. P. 1-15.
13. Visky D., Heyden Y.V., Ivanyi T., Batten P., De Beer J., Kovacs Z., Noszal B., Roets E., Massart D.L., Hoogmartens J. Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests. Evaluation of 36 test parameters: repeatability, reproducibility and correlation. // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 977. P. 35-58.

14. Dorsey J.G., Rogers S.D. Chromatographic silanol activity test procedures: The Quest for a universal test. // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 892. P. 57-65.
15. Dolan J.W., Snyder L.R., Jupille T.H., Wilson N.S. Variability of column selectivity for reversed-phase high-performance liquid chromatography. Compensation by adjustment of separation conditions. // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 960. P. 51-67.
16. Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию. // Ред. Д. Исии, М., Мир, 1991. - 240 стр.
17. Baram G.I. Portable liquid chromatograph for mobile laboratories. I. Aims. // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 728. P. 387-399.
18. Vissers J.P.C. Recent developments in microcolumn liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 856. P. 117-143.
19. Done J.N. Sample loading and efficiency in adsorption, partition and bonded-phase high-speed liquid chromatography. // *J. Chromatogr.* 1976. V. 125. P. 43-57.
20. Количественный анализ хроматографическими методами. // Ред. Э. Кец, М., Мир, 1990. - 320 стр.
21. Basic liquid chromatography. N. Hadden, F. Baumann, F. MacDonald, et al. - Varian Aerograph, 1971.
22. Brozmanova H., Grundmann M., Safarczyk K., Jegorov A. High-performance liquid chromatographic method for therapeutic drug monitoring of cyclosporine A and its two metabolites in renal transplant patients. // *J. Chromatogr. B.* 2000. V. 749. P. 93-100.
23. Chow D.S.-L., Bhagwatwar H.P., Phadungpojna S., Andersson B.S. Stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay of busulfan in aqueous and plasma samples. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 704. P. 277-288.
24. Ong C.P., Chow K.K., Ng C.L., Ong F.M., Lee H.K., Li S.F.Y. Use of overlapping resolution mapping scheme for optimization of the high-performance liquid chromatographic separation of pharmaceuticals. // *J. Chromatogr. A.* 1995. V. 692. P. 207-212.
25. Wolcott R.G., Dolan J.W., Snyder L.R. Computer simulation for the convenient optimization of isocratic reversed-phase liquid chromatographic separations by varying temperature and mobile phase strength. // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 869. P. 3-25.
26. Torres-Lapasio J.R., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Baeza-Baeza J.J. Global treatment of chromatographic data with MICHROM. // *Anal. Chim. Acta.* 1997. V. 348. P. 187-196.
27. Wilson N.S., Morrison R., Dolan J.W. Buffers and baselines. // *LC GS Europe.* 2001. № 7. P. 1-3.
28. Tindall G.W. Mobile-Phase Buffers, part II-buffer selection and capacity. // *LC-GC North America.* 2002. V. 20. № 12. P. 1-7.

29. Kimura M., Kanehira K., Yokoi K. Highly sensitive and simple liquid chromatographic determination in plasma of B₆ vitamers, especially pyridoxal 5'-phosphate. // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 722. P. 295-301.
30. Sergeev N.V., Gloukhova N.S., Nazimov I.V., Gulyaev V.A., Shvets S.V., Donetsky I.A., Miroshnikov A.I. Monitoring of recombinant human insulin production by narrow-bore reversed-phase high-performance liquid chromatography, high-performance capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 907. P. 131–144.
31. 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.
32. Li H.B., Chen F. Simultaneous determination of twelve water- and fat-soluble vitamins by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. // *Chromatographia.* 2001. V. 54. № 3-4. P. 270-273.
33. Van Heeswijk R.P.G., Hoetelmans R.M.W., Meenhorst P.L., Mulder J.W., Beijnen J.H. Rapid determination of nevirapine in human plasma by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. // *J. Chromatogr. B.* 1998. V. 713. P. 395–399.
34. Marzolini C., Telenti A., Buclin T., Biollaz J., Decosterd L.A. Simultaneous determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. // *J. Chromatogr. B.* 2000. V. 740. P. 43–58.
35. Svensson J.-O., Barkholt L., SaWe J. Determination of acyclovir and its metabolite 9-carboxymethoxymethylguanine in serum and urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 690. P. 363–366.
36. Hosotsubo H., Takahara S., Kokado Y., Permpongkosol S., Wang J.-D., Tanaka T., Matsumiya K., Kitamura M., Okuyama A., Sugimoto H. Rapid and simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronide conjugate in human plasma by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography using isocratic elution. // *J. Chromatogr. B.* 2001. V. 753. P. 315–320.
37. Burger D.M., De Graaff M., Wuis E.W., Koopmans P.P., Hekster Y.A. Determination of indinavir, an HIV-protease inhibitor, in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 703. P. 235–241.
38. Zhu P.L., Snyder L.R., Dolan J.W., Djordjevic N.M., Hill D.W., Sander L.C., Waeghe T.J. Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution. I. Predicting separation as a function of temperature and gradient conditions. // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 756. P. 21–39.

39. Zhu P.L., Dolan J.W., Snyder L.R., Hill D.W., Van Heukelem L., Waeghe T.J. Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution. III. Selectivity for ionizable samples as a function of sample type and pH. // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 756. P. 51–62.
40. Dimov N., Simova M. Unexpected behavior of digoxin at elevated temperatures in reversed-phase liquid chromatography. // *Chromatographia*. 1999. V. 49. P. 306–308.
41. Dolan J.W., Snyder L.R., Djordjevic N.M., Hill D.W., Saunders D.L., Van Heukelem L., Waeghe T.J. Simultaneous variation of temperature and gradient steepness for reversed-phase high-performance liquid chromatography method development. Application to 14 different samples using computer simulation. // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 803. P. 1–31.
42. Cela R., Lores M. Preopt-W: A simulation program for off-line optimisation of binary gradient separation in HPLC-I. Fundamentals and overview. // *Comp. Chem.* 1996. V. 20. P. 175–191.
43. Rozman E., Galceran M.T., Albet C. Determination of ebrotidine and its metabolites in human urine by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B*. 1997. V. 688. P. 107–115.
44. Hartter S., Weigmann H., Hiemke C. Automated determination of reboxetine by high-performance liquid chromatography with column-switching and ultraviolet detection. // *J. Chromatogr. B*. 2000. V. 740. P. 135–140.
45. Хубер Л. Применение диодно-матричного детектирования в ВЭЖХ. // М., Мир, 1993. – 34 стр.
46. Gaillard Y., Pepin G. Use of high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection for the creation of a 600-compound library. Application to forensic toxicology. // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 763. P. 149–163.
47. Maier R.D., Bogusz M. Identification power of standardized HPLC-DAD system for systematic toxicological analysis. // *J. Anal. Toxicol.* 1995. V. 19. P. 79–83.
48. Wilhelm M., Battista H.-J., Obendorf D. Selective and sensitive assay for the determination of benzodiazepines by high-performance liquid chromatography with simultaneous ultraviolet and reductive electrochemical detection at the hanging mercury drop electrode. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 897. P. 215–225.
49. Yamada H., Yoshizawa K., Hayase T. Sensitive determination method of estradiol in plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. // *J. Chromatogr. B*. 2002. V. 775. P. 209–213.
50. Hara S., Mochinaga S., Fukuzawa M., Ono N., Kuroda T. Simple and highly sensitive determination of morphine in rat plasma by liquid chromatography with fluorescence detection. // *Anal. Chim. Acta*. 1999. V. 387. P. 121–126.
51. Albertione F., Pettersson B., Beck O., Rask C., Seideman P., Peterson C. Simultaneous quantitation of methotrexate and its two main metabolites in biological fluids by a novel solid-phase extraction procedure using high-

- performance liquid chromatography. // J. Chromatogr. B. 1995. V. 665. P. 163–170.
52. Ofner B., Winterstaiger R. Minimization of plasma interferences by liquid chromatography with electrochemical detection after ultraviolet irradiation using chlordiazepoxide as model substance. // Anal. Chim. Acta. 1995. V. 305. P. 318–323.
53. Macher M., Winterstaiger R. Improved electrochemical detection of diuretics in high-performance liquid chromatographic analysis by postcolumn on-line photolysis. // J. Chromatogr. A. 1995. V. 709. P. 257–264.
54. Bogusz M.J., Maier R.-D., Kruger K.-D., Fruchtnicht W. Determination of flunitrazepam and its metabolites in blood by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. // J. Chromatogr. B. 1998. V. 713. P. 361–369.
55. Marquet P., Lachatre G. Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. // J. Chromatogr. B. 1999. V. 733. P. 93–118.
56. Drummer O.H. Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. // J. Chromatogr. B. 1999. V. 733. P. 27–45.
57. Lu J., Cwik M., Kanyok T. Determination of paromomycin in human plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography using 2,4-dinitrofluorobenzene derivatization. // J. Chromatogr. B. 1997. V. 695. P. 329–335.
58. Zhu Z., Neirinck L. High-performance liquid chromatographic method for the determination of gabapentin in human plasma. // J. Chromatogr. B. 2002. V. 779. P. 307–312.
59. Tawa R., Matsunaga H., Fujimoto T. High-performance liquid chromatographic analysis of aminoglycoside antibiotics. // J. Chromatogr. A. 1998. V. 812. P. 141–150.
60. Eggenreich K., Zeipper U., Schwendenwein E., Hadju S., Kaltenecker G., Laslo I., Lang S., Roschger P., Vecsei V., Wintersteiger R. Determination of bone and tissue concentrations of teicoplanin mixed with hydroxyapatite cement to repair cortical defects. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2002. V. 53. P. 51–59.
61. Погодаева Н.Н., Трофимов В.Н., Горшков А.Г., Барам Г.И., Зайков К.Л., Сырчина А.И., Семенов А.А. Количественное определение глицинбетаина в надземной части *Salsolla collna pall.* // Хим.-фарм. журнал. 1992. № 9-10. С. 94-96.
62. Saleg N., Pertat N., Dutertre H., Dumontet M. Rapid, specific and sensitive method for isoniazid determination in serum. // J. Chromatogr. B. 1996. V. 675. P. 113–117.
63. Steiner F., Beck W., Engelhardt H. Optimization of indirect ultraviolet detection in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. // J. Chromatogr. A. 1996. V. 736. P. 11–23.

64. Wahlung K.-G. Separation of acidic drugs in the $\mu\text{g/ml}$ range in untreated blood plasma by direct injection on liquid chromatographic columns. // *J. Chromatogr.* 1981. V. 218. P. 671-679.
65. Murtaza R., Jackman H.L., Alexander B., Lleshi-Tali A., Winnie A.P., Igic R. Simultaneous determination of mepivacaine, tetracaine, and p-butylaminobenzoic acid by high-performance liquid chromatography. // *J. Pharmacol. and Toxicol. Methods.* 2002. V. 46. P. 131–136.
66. Polson C., Sarkar P., Incledon B., Raguvaran V., Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B.* 2003. V. 785. P. 263–275.
67. Sato J., Amizuka T., Niida Y., Umetsu M., Ito K. Simple, rapid and sensitive method for the determination of indomethacin in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 692. P. 241–244.
68. Cociglio M., Peyriere H., Hillaire-Buys D., Alric R. Application of a standardized coextractive cleanup procedure to routine high-performance liquid chromatography assays of teicoplanin and ganciclovir in plasma. // *J. Chromatogr. B.* 1998. V. 705. P. 79–85.
69. Shin J.-G., Kim K.-A., Yoon Y.-R., Cha I.-J., Kim Y.-H., Shin S.-G. Rapid simple high-performance liquid chromatographic determination of paroxetine in human plasma. // *J. Chromatogr. B.* 1998. V. 713. P. 452–456.
70. Guellec C.L., Gaudet M.L., Breteau M. Improved selectivity for high-performance liquid chromatographic determination of clonazepam in plasma of epileptic patients. // *J. Chromatogr. B.* 1998. V. 719. P. 227–233.
71. De Cazanove F., Kinowski J.-M., Audran M., Rochette A., Bressole F. Determination of nalbuphine in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Application to a pharmacokinetic study. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 690. P. 203-210.
72. Foglia J.P., Sorisio D., Kirshner M., Pollock B.G. Quantitative determination of paroxetine in plasma by high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 693. P. 147–151.
73. Teitz D.S., Khan S., Powell M. L., Jemal M. An automated method of sample preparation of biofluids using pierceable caps to eliminate the uncapping of the sample tubes during sample transfer. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2000. V. 45. P. 193–204.
74. Cheng Y.-F., Neue U.D., Bean L. Straightforward solid-phase extraction method for the determination of verapamil and its metabolite in plasma in a 96-well extraction plate. // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 828. P. 273–281.
75. Huck C.W., Bonn G.K. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 885. P. 51–72.

76. Arcelloni C., Lanzi R., Pedercini S., Molteni G., Fermo I., Pontiroli A., Paroni R. High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction. // *J. Chromatogr. B.* 2001. V. 763. P. 195–200.
77. Mutlib A.E., Strupczewski J.T. Picogram determination of iloperidone in human plasma by solid-phase extraction and by high-performance liquid chromatography-selected-ion monitoring electrospray mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B.* 1995. V. 669. P. 237–246.
78. Stanley S.M.R., Owens N.A., Rodgers J.P. Detection of flunixin in equine urine using high-performance liquid chromatography with particle beam and atmospheric pressure ionization mass spectrometry after solid-phase extraction. // *J. Chromatogr. B.* 1995. V. 667. P. 95–103.
79. Cosbey S.H., Craig I., Gill R. Novel solid-phase extraction strategy for the isolation of basic drugs from whole blood. Preliminary study using commercially available extraction cartridges. // *J. Chromatogr. B.* 1995. V. 669. P. 229–235.
80. Olesen O.V., Plougmann P., Linnet K. Determination of nortriptyline in human serum by fully automated solid-phase extraction and on-line high-performance liquid chromatography in the presence of antipsychotic drugs. // *J. Chromatogr. B.* 2000. V. 746. P. 233–239.
81. Christians U., Jacobsen W., Serkova N., Benet L.Z., Vidal C., Sewing K.-F., Manns M.P., Kirchner G.I. Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography–mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. // *J. Chromatogr. B.* 2000. V. 748. P. 41–53.
82. Brunetto M.R., Obando M.A., Fernandez A., Gallignani M., Burguera J.L., Burguera M. Column-switching high-performance liquid chromatographic analysis of carbamazepine and its principal metabolite in human plasma with direct sample injection using an alkyl-diol silica (ADS) precolumn. / *Talanta.* 2000. V. 58. P. 535-542.
83. Vielhauer S., Rudolphi A., Boos K.-S., Seidel D. Evaluation and routine application of the novel restricted-access precolumn packing material Alkyl-Diol Silica: coupled-column high-performance liquid chromatographic analysis of the photoreactive drug 8-methoxypsoralen in plasma. // *J. Chromatogr. B.* 1995. V. 666. P. 315-322.
84. Yu Z., Westerlung D. Direct injection of large volumes of plasma in a column-switching system for the analysis of local anaesthetics. II. Determination of bupivacaine in human plasma with an alkyl-diol silica precolumn. // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 725. P. 149-155.
85. Chiap P., Rbeida O., Christiaens B., Hubert Ph., Lubda D., Boos K.-S., Crommen J. Use of a novel cation-exchange restricted-access material for automated sample clean-up prior to the determination of basic drugs in plasma by liquid chromatography. // *J. Chromatography A.* 2002. V. 975. P. 145–155.

86. Yu Z., Westerlung D. Direct injection of large volumes of plasma in a column-switching system for the analysis of local anaesthetics. I. Optimisation of semi-permeable surface precolumn in the system and characterization of some interference peaks. // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 725. P. 137-147.
87. Misl'anova C., Hutta M. Influence of various biological matrices (plasma, blood, microdialysate) on chromatographic performance in the determination of β -blockers using an alkyl-diol silica precolumn for sample clean-up. // *J. Chromatogr. B*. 2001. V. 765. P. 167-177.
88. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. // Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, Maryland, May 2001.
89. ОСТ 42-510-98. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP): Стандарт отрасли, М., 1998.
90. О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации: Приказ МЗ РФ от 7 февр. 2000г. №45. // *Рос. газ.* – 2000. – 20 февр. – С. 4.
91. Maurer H.H. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/ or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/ or doping control. // *J. Chromatogr. B*. 1999. V. 733. P. 3-25.
92. De Zeeuw R.A. Drug screening in biological fluids. The need for a systematic approach. // *J. Chromatogr. B*. 1997. V. 689. P. 71-79.
93. Peyrin E., Guillaume Y.C., Morin N., Guinchard C. Retention behavior of D,L-dansyl-amino acids on a human serum albumin chiral stationary phase: effect of a mobile phase modifier. // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 808. P. 113-120.
94. Барам Г.И., Грачев С.А. Использование перхлората лития при выделении и анализе олиго- и полинуклеотидов. // *Биоорганич. химия*. 1985. Т. 11. №. 10. С. 1420-1422.
95. Guan F., Uboh C. E., Soma L. R., Birks E. K., Teleis D., Rudy J. A., Watson A. O., Tsang D. S. Quantification of phenytoin and its metabolites in equine plasma and urine using high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B*. 2000. V. 746. P. 209-218.
96. Moriyama M., Yamashita S., Domoto H., Furuno K., Araki H., Gomita Y. Determination of plasma phenobarbital concentration by high-performance liquid chromatography in rat offspring. // *J. Chromatogr. B*. 1999. V. 723. P. 301-305.
97. Chollet D., Castella E., Combe P., Arnera V. High-speed liquid chromatographic method for the monitoring of carbamazepine and its active metabolite, carbamazepine-10,11-epoxide, in human plasma. // *J. Chromatogr. B*. 1996. V. 683. P. 237-243.
98. Romanyshyn L.A, Wichmann J.K, Kucharczyk N, Shumaker R.C, Ward D, Sofia R.D. Simultaneous determination of felbamate, primidone, phenobarbital, carbamazepine, two carbamazepine metabolites, phenytoin, and one phenytoin

- metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. // *Ther. Drug Monit.* 1994. V. 16. № 1. P. 90-99.
99. Cooper J.D.H., Shearsby N.J., Taylor J.E., Fook Sheung C.T.C. Simultaneous determination of lamotrigine and its glucuronide and methylated metabolites in human plasma by automated sequential trace enrichment of dialysates and gradient high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 702. P. 227–233.
 100. Ferranti V., Chabenat C., Menager S., Lafont O. Simultaneous determination of primidone and its three major metabolites in rat urine by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. // *J. Chromatogr. B.* 1998. V. 718. P. 199–204.
 101. Bugamelli F., Sabbioni C., Mandrioli R., Kenndler E., Albani F., Raggi M.A. Simultaneous analysis of six antiepileptic drugs and two selected metabolites in human plasma by liquid chromatography after solid-phase extraction. // *Anal. Chim. Acta.* 2002. V. 472. P. 1–10.
 102. Matar K.M., Nicholls P.J., Tekle A., Bawazir S.A., Al-Hassan M.I. Liquid chromatographic determination of six antiepileptic drugs and two metabolites in microsamples of human plasma. // *Ther. Drug Monit.* 1999. V. 21. P. 559-566.
 103. Nakamura M., Kondo K., Nishioka R., Kawai S. Improved procedure for the high-performance liquid chromatographic determination of valproic acid in serum as its phenacyl ester. // *J. Chromatogr.* 1984. V. 310. P. 450–454.
 104. Liu H., Forman L.J., Montoya J., Eggers C., Barham C., Delgado M. Determination of valproic acid by high-performance liquid chromatography with photodiode-array and fluorescence detection. // *J. Chromatogr.* 1992. V. 576. P. 163-169.
 105. Barbosa N.R., Mýdio A.F. Validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in human plasma. // *J. Chromatogr. B.* 2000. 741. P. 289–293.
 106. Cooper J.D.H., Shearsby N.J., Taylor J.E., Fook Sheung C.T.C. Simultaneous determination of lamotrigine and its glucuronide and methylated metabolites in human plasma by automated sequential trace enrichment of dialysates and gradient high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 702. P. 227–233.
 107. Castel-Branco M.M., Almeida A.M., Falcao A.C., Macedo T.A., Caramona M.M., Lopez F.G. Lamotrigine analysis in blood and brain by high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B.* 2001. V. 755. P. 119–127.
 108. Bugamelli F., Sabbioni C., Mandrioli R., Kenndler E., Albani F., Raggi M.A. Simultaneous analysis of six antiepileptic drugs and two selected metabolites in human plasma by liquid chromatography after solid-phase extraction. // *Anal. Chim. Acta.* 2002. V. 472. P. 1–10.

109. Cociglio M., Hillaire-Buys D., Alric C. Determination of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate by liquid chromatography for routine monitoring of plasma levels. // *J. Chromatogr. B.* 1995. V. 674. P. 101-110.
110. Hirai T., Matsumoto S., Kishi I. Determination of methotrexate and its main metabolite 7-hydroxymethotrexate in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 690. P. 267-273.
111. Florida L., Pietropaolo A.M., Tavazzani M., Rubino F.M., Colombi A. High-performance liquid chromatography of methotrexate for environmental monitoring of surface contamination in hospital departments and assessment of occupational exposure. // *J. Chromatogr. B.* 1999. V. 726. P. 95-103.
112. Yu Z., Westerlund D. Ion-pair chromatography of methotrexate in a column-switching system using an alkyl-diol silica precolumn for direct injection of plasma. // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 742. P. 113-120.
113. Aboleneen H., Simpson J., Backes D. Determination of methotrexate in serum by high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B.* 1996. V. 681. P. 317-322.
114. Howell S.K., Wang Y.M., Hosoya R., Sutow W.W. Plasma methotrexate as determined by liquid chromatography, enzyme-inhibition assay, and radioimmunoassay after high-dose infusion. // *Clin. Chem.* 1980. V. 26. P. 734-737.
115. Sharma P., Chawla H. P. S., Panchagnula R. Analytical method for monitoring concentrations of cyclosporin and lovastatin in vitro in an everted rat intestinal sac absorption model. // *J. Chromatogr. B.* 2002. V. 768. P. 349-359.
116. Chimalakonda A.P., Shah R.B., Mehvar R. High-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporin A in rat blood and liver using a commercially available internal standard. // *J. Chromatogr. B.* 2002. V. 772. P. 107-114.
117. Kabra P.M., Wall J.H., Blanckaert N. Solid-phase extraction and liquid chromatography for improved assay of cyclosporine in whole blood or plasma. // *Clin. Chem.* 1985. V. 31. P. 1717-1720.
118. Khoschorur G., Semmelrock H.J., Rodl S., Auer T., Petek W., Iberer F., Tscheliessnigg K.H. Rapid, sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of cyclosporine A and its metabolites M1, M17 and M21. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 690. P. 367-372.
119. Golabi N., Tajerzadeh H., Ghassempour A. A rapid and selective LC method for simultaneous determination of cyclosporin a and its major metabolite (AM1) in human serum at room temperature. // *Talanta.* 2003. V. 59. P. 1089-1094.
120. Bowers L.D., Mathews S.E. Investigation of the mechanism of peak broadening observed in the high-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporine. // *J. Chromatogr.* 1985. V. 333. P. 231-238.

121. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. Ред. А. Хеншен, К.-П. Хупе, Ф. Лотшпайх, В. Вельтер. М., Мир, 1998.
122. 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.
123. Robertson M.D., Drammer O.H. High-performance liquid chromatographic procedure for the measurement of nitrobenzodiazepines and their 7-amino metabolites in blood. // *J. Chromatogr. B*. 1995. V. 667. P. 179–184.
124. Tanaka E., Terada M., Misawa S., Wakasugi C. Simultaneous determination of twelve benzodiazepines in human serum using a new reversed-phase chromatographic column on a 2- μ m porous microspherical silica gel. // *J. Chromatogr. B*. 1996. V. 682. P. 173–178.
125. Sallustio B.C., Kassapidis C., Morris R.G. High-performance liquid chromatography determination of clonazepam in plasma using solid-phase extraction. // *Ther. Drug Monit.* 1994. V. 16. P. 174-178.
126. El Mahjoub A., Staub C. High-performance liquid chromatographic method for the determination of benzodiazepines in plasma or serum using the column-switching technique. // *J. Chromatogr. B*. 2000. V. 742. P. 381–390.
127. Характеристики погрешности результатов количественного химического анализа. Алгоритмы оценивания: Рекомендация. Государственная система обеспечения единства измерений. МИ 2336-95 (изд. второе). Екатеринбург, 1998.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДМД – детектор с диодной матрицей

ЖЖЭ – жидко-жидкостная экстракция

ЖХ – жидкостная хроматография

ЛВ – лекарственное вещество

МС – масс-спектрометрический детектор

ОФ – обращенная фаза, обращено-фазный

ПСП – противосудорожные препараты

ПФ – подвижная фаза

СО – стандартный образец

ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг

ТФЭ – твердофазная экстракция

УФ – ультрафиолетовый

ФЛ – флуоресцентный

ФМ – фотометрический

ЭХ – электрохимический

Таблица 1. Структурные формулы и молекулярные массы ЛВ, подлежащих мониторингу в РФ.

Название ЛВ	Структурная формула	Молекулярная масса
1	2	3
Дигитоксин		764,9
Дигоксин		780,9
Дизопирамид (Ритмилен)		339,5
Лидокаин		234,3
Мексилетин (Мекситил)		179,3
Хинидин		324,5
Теofilлин		180,2
Амитриптилин		277,4
Галоперидол		375,9
Диазепам (Седуксен)		284,7

Таблица 1 (продолжение)

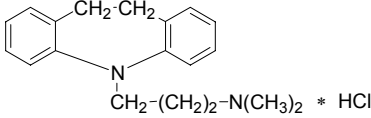
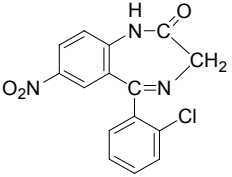
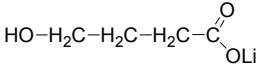
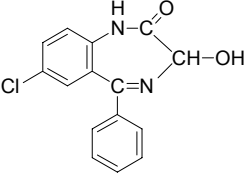
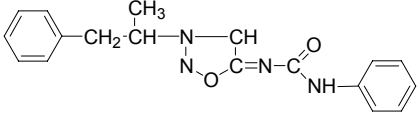
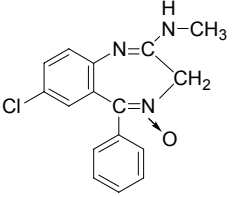
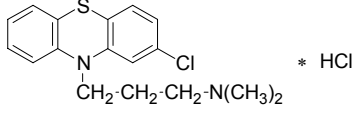
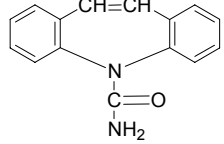
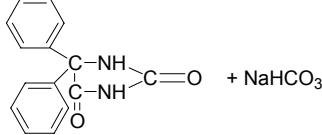
1	2	3
Имипрамин (Имизин)		280,4
Клоназепам		315,7
Препараты лития	Li_2CO_3 Лития карбонат  $\text{HO}-\text{H}_2\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{OLi}$ Лития оксибутират	
Оксазепам (Тазепам)		286,7
Сиднокарб		
Хлордiazепоксид (Элениум)		299,8
Хлорпромазин (Аминазин)		355,3
Карбамазепин (Тегретол)		236,3
Фенитоин (Дифенин)		252,3

Таблица 1 (продолжение)

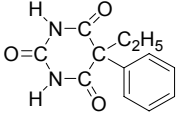
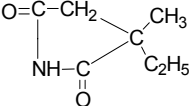
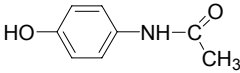
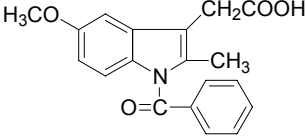
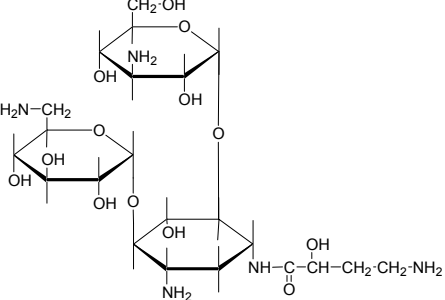
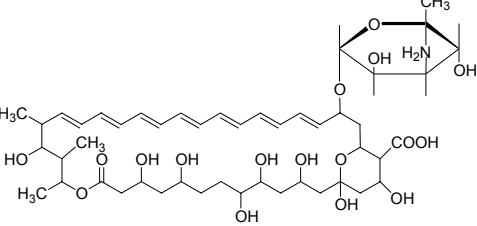
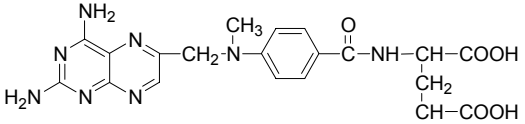
1	2	3
Фенобарбитал		232,2
Этосуксимид		141,2
Вальпроат натрия	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-C(=O)OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH} \end{array}$ (или ONa)	166,2
Ацетаминофен (Парацетамол)		151,2
Индометацин		357,8
Амикацин		585,6
Амфотерицин		924,1
Метотрексат		454,5

Таблица 1 (продолжение)

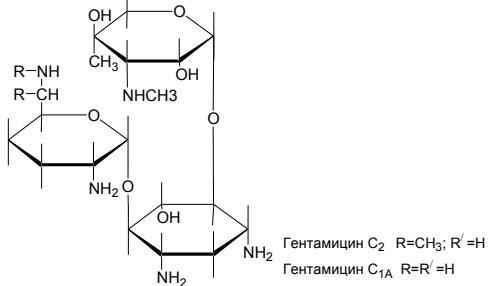
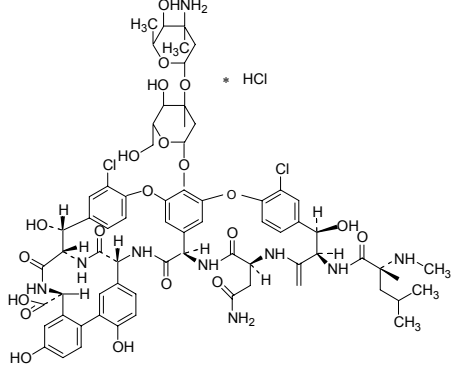
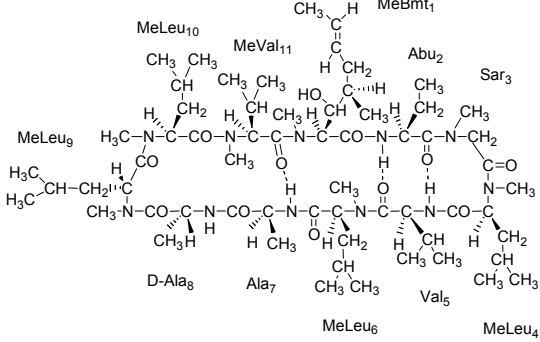
1	2	3
Гентамицин	 <p>Гентамицин C₂ R=CH₃; R'=H Гентамицин C_{1A} R=R'=H</p>	463
Ванкомицин	 <p>* HCl</p>	1486
Циклоспорин		1203

Таблица 1. Структурные формулы и молекулярные массы ЛВ, рекомендованных для мониторинга в США.

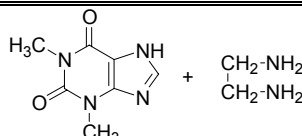
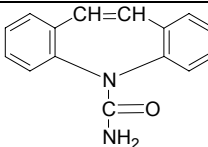
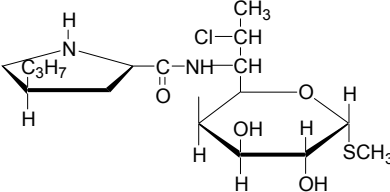
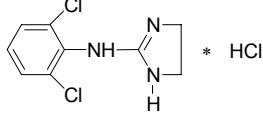
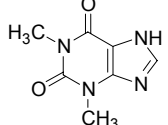
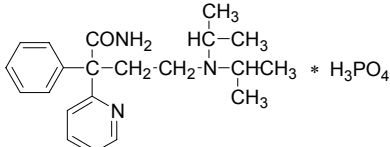
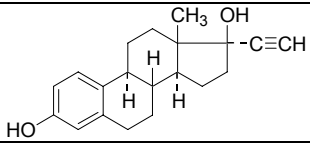
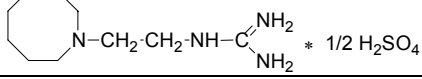
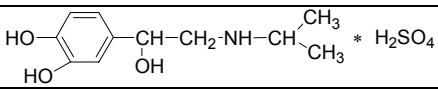
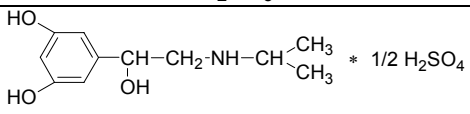
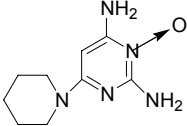
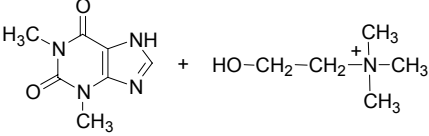
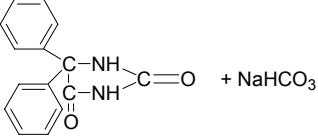
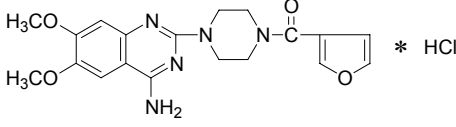
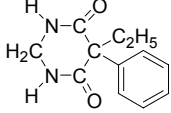
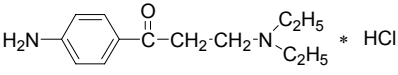
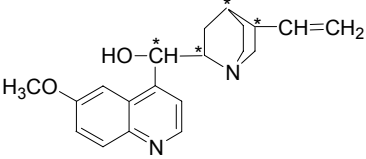
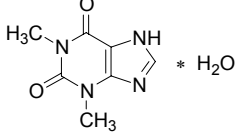
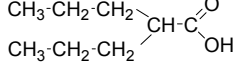
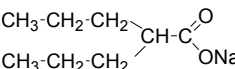
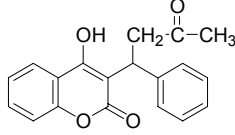
Название ЛВ	Структурная формула	Молекулярная масса
1	2	3
Аminophylline (Эуфиллин)		420,4
Carbamazepine (Карбамазепин)		236,3
Clindamycin HCl		461,5
Clonidine HCl		266,6
Dyphylline (Теофиллин)		180,2
Disopyramide phosphate		437,5
Etinil Estradiol/Progestin		
Guanetidine sulphate (Октадин)		296,4
Isoetharine Mesylate*		
Isoproterenol sulphate (Изадрин)		
Lithium Carbonate	Li ₂ CO ₃	
Metaproterenol sulphate (Орципреналина сульфат)		520,6

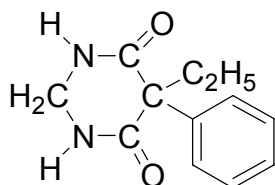
Таблица 1 (продолжение).

1.	2.	3.
Minoxidil		209,3
Oxtriphylline (Холина теофиллинат)		
Phenytoin (Дифенин)		252,3
Prazosin HCl		419,9
Primidone (Гексамидин)		218,3
Procainamide HCl (Новокаин-амид)		271,8
Quinidine		324,5
Theophylline		180,2
Valproic Acid		144,2
Divalproex sodium (Депакин)		166,2
Warfarin		308,3

Гексамидин*

Desoxyphenobarbitone, Lepimidin, Lespiral, Liskantin, Mizodin, Mylepsin, Mysoline, Primaclon, **Primidone***, Primoline, Prisoline, Sedilen, Sertan и др.

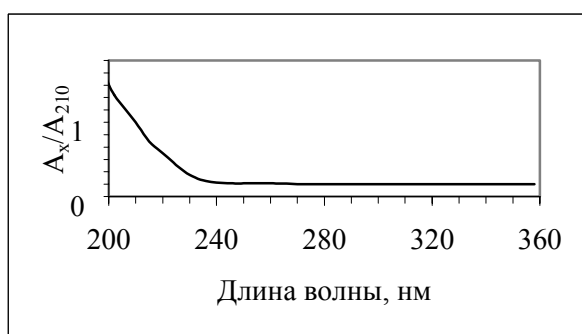
* Международные непатентованные названия, принятые ВОЗ (МНН)



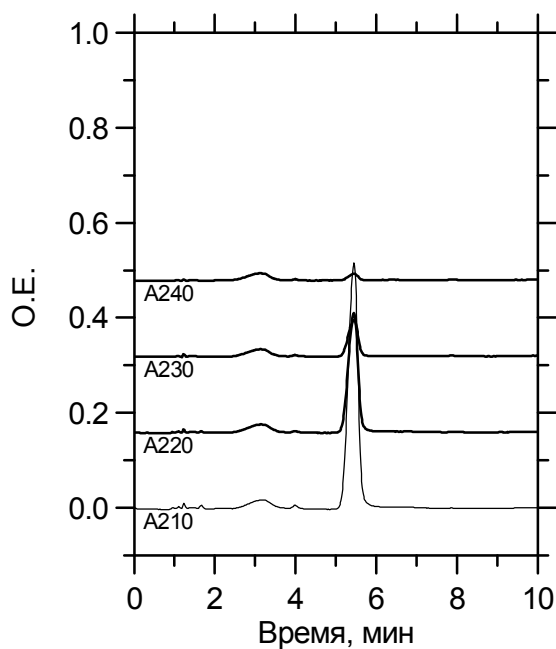
ММ 218.23

Терапевтическая концентрация - 5-12 мкг/мл

Токсическая концентрация - 15 мкг/мл



Спектральное отношение, $R=S_x/S_{210}$		
220	230	240
0,486	0,148	0,025



Колонка: Ø2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюенты: А- 0.2 М LiClO₄, pH 3;

Б- CH₃CN

Подвижная фаза: 15%Б 10 мин

Скорость потока: 150 мкл/мин

Температура колонки: 40°C

Детектор: 210, 220, 230, 240 нм; τ=0.34 сек;
однолучевой режим

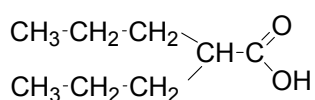
Образец: раствор гексамидина в метаноле,
100 мкг/мл

Объем пробы: 4 мкл

Вальпроевая кислота*

Депакин, Конвулекс, Конвульсофин, **Convulex***, Convulsofin, Deraken, Derakin, Derakine, Epilim, Labazene, Propymal, Valproate sodium и др.

* Международные непатентованные названия, принятые ВОЗ (МНН)



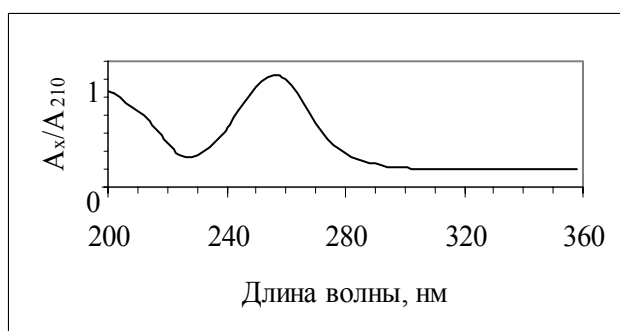
ММ 166,2

pK_a 4,95

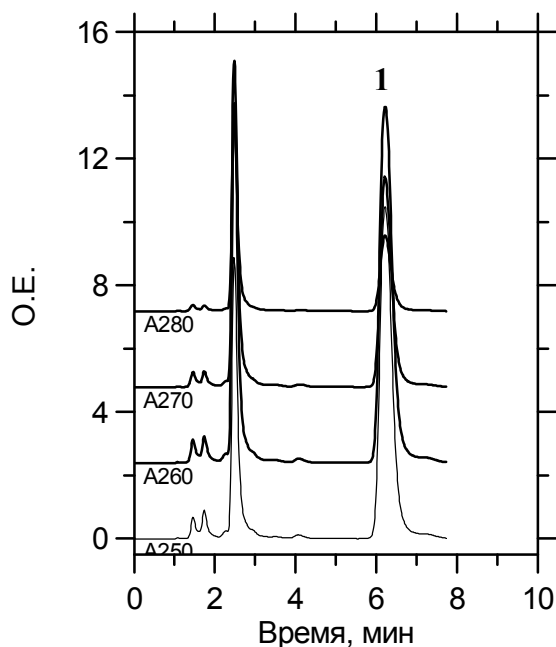
Терапевтическая концентрация – 40-100 мкг/мл

Токсическая концентрация – 120-150 мкг/мл

Определение выполняется в виде *para*-бромфенацилового эфира:



Спектральное отношение, R=S _x /S ₂₆₀		
250	270	280
0,915	0,544	0,191



Колонка: Ø2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюенты: А- 0.2 М LiClO₄, pH 3;

Б- CH₃CN

Подвижная фаза: 70%Б 10 мин

Скорость потока: 150 мкл/мин

Температура колонки: 40°C

Детектор: 250, 260, 270, 280 нм; τ=0.34 сек;
однолучевой режим

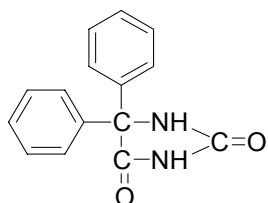
Образец: *n*-бромфенациловый эфир
вальпроевой кислоты, 100 мкг/мл
1- *n*-бромфенациловый эфир
вальпроевой кислоты

Объем пробы: 5 мкл

Дифенин*

Alepsin, Dihydantoin, Dilantin sodium, Diphedan, Diphentoin, Epanutin, Eptoin, Hydantal, Hydantoinal, **Phenytoinum***, Sodanton, Solantoin, Solantyl и др.

* Международные непатентованные названия, принятые ВОЗ (МНН)

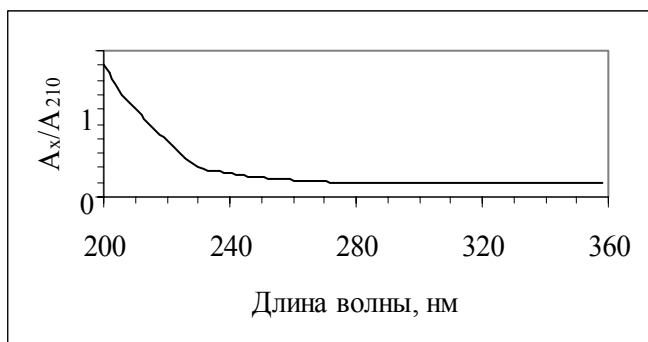


ММ 252.3

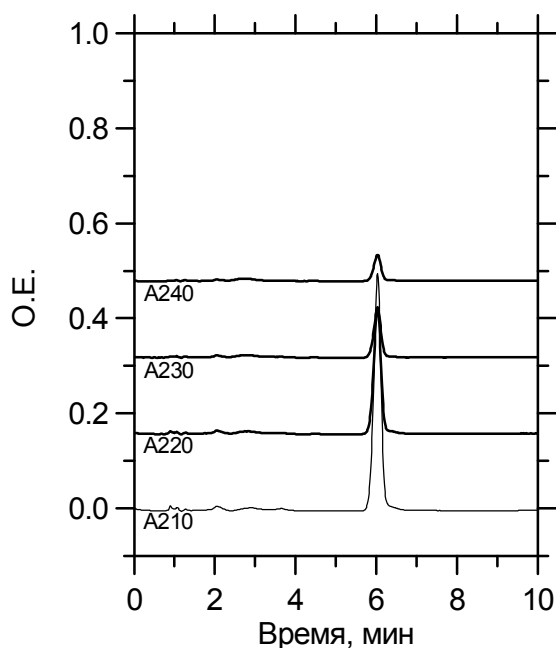
pK_a 8.3~8.6

Терапевтическая концентрация – 5-20 мкг/мл

Токсическая концентрация – 20 мкг/мл



Спектральное отношение, $R=S_x/S_{210}$		
220	230	240
0,540	0,208	0,116



Колонка: $\varnothing 2 \times 75$ мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюенты: А- 0.2 М LiClO₄, pH 3;

Б- CH₃CN

Подвижная фаза: 30%Б 10 мин

Скорость потока: 150 мкл/мин

Температура колонки: 40°C

Детектор: 210, 220, 230, 240 нм; $\tau=0.34$ с;
однолучевой режим

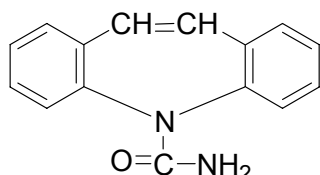
Образец: раствор дифенина в метаноле,
100 мкг/мл

Объем пробы: 4 мкл

Карбамазепин*

Финлепсин*, Стазепин*, Тегретол*, Amizepin, Carbagretil, Carbazer,
 Carbamazepin*, Finlepsin, Mazetol, Neurotol, Tegretal, Tegretol, Stazepin.

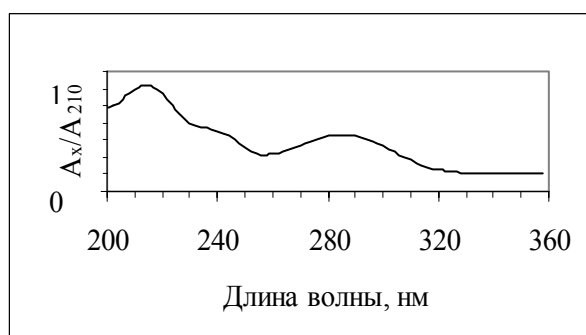
* Международные непатентованные названия, принятые ВОЗ (МНН)



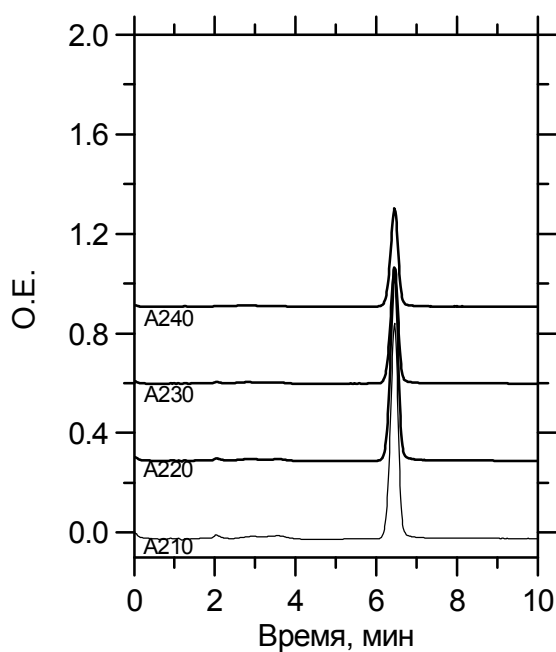
ММ 236.3

Терапевтическая концентрация – 2-12 мкг/мл

Токсическая концентрация – 10 мкг/мл



Спектральное отношение, $R=S_x/S_{210}$		
220	230	240
0,889	0,541	0,457



Колонка: $\varnothing 2 \times 75$ мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюенты: А- 0.2 М LiClO₄, pH 3;

Б- CH₃CN

Подвижная фаза: 30%Б 10 мин

Скорость потока: 150 мкл/мин

Температура колонки: 40°C

Детектор: 210, 220, 230, 240 нм; $\tau=0.34$ с;

однолучевой режим

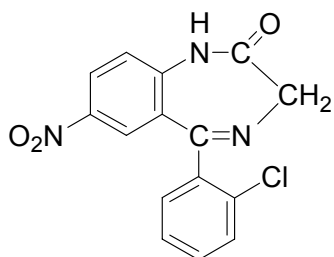
Образец: раствор карбамазепина в метаноле, 100 мкг/мл

Объем пробы: 4 мкл

Клоназепам*

Антелепсин*, Antelepssiin, Clonazepam, Clonopin, Iktoril, Iktorivil, Ravatril, Ravotril, Rivatril, Rivotril и др.

* *Международные непатентованные названия, принятые ВОЗ (МНН)*



ММ 315.7

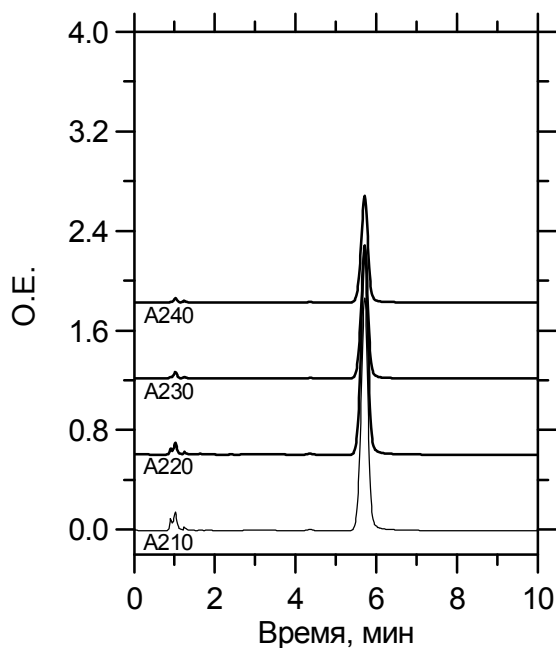
pK_a 1.5; 10.5

Терапевтическая концентрация – 0,01-0,08 мкг/мл

Токсическая концентрация – 0,1 мкг/мл



Спектральное отношение, $R=S_x/S_{210}$		
220	230	240
0,901	0,561	0,459



Колонка: $\varnothing 2 \times 75$ мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюенты: А- 0.2 М LiClO₄, pH 3;

Б- CH₃CN

Подвижная фаза: 35%Б 10 мин

Скорость потока: 150 мкл/мин

Температура колонки: 40°C

Детектор: 210, 220, 230, 240 нм; $\tau=0.34$ с;

однолучевой режим

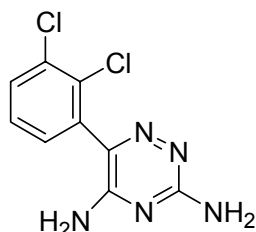
Образец: раствор клоназепама в метаноле,
100 мкг/мл

Объем пробы: 4 мкл

Ламиктал*

Lamictal*, Lamotrigine (BW430C)*

* Международные непатентованные названия, принятые ВОЗ (МНН)

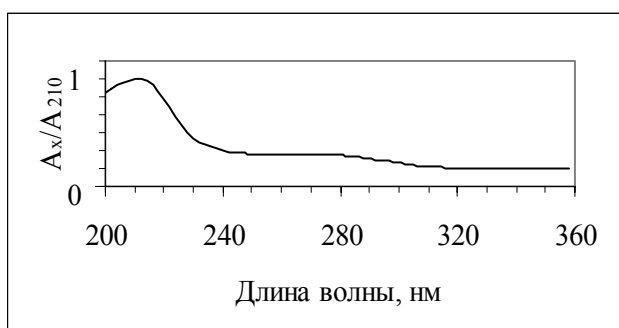


ММ 256.1

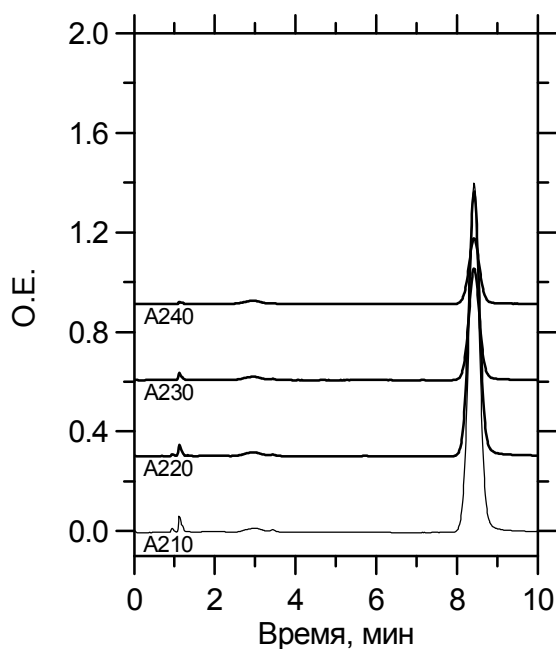
рK_a 5,5

Терапевтическая концентрация – 0,5 (1)-3 (12) мкг/мл

Токсическая концентрация – (2) 20 мкг/мл



Спектральное отношение, R=S _x /S ₂₁₀		
220	230	240
0,757	0,321	0,189

**Колонка:** Ø2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18**Элюенты:** А- 0.2 М LiClO₄, рН 3;**Б-** CH₃CN**Подвижная фаза:** 20%Б 10 мин**Скорость потока:** 150 мкл/мин**Температура колонки:** 40°С**Детектор:** 210, 220, 230, 240 нм; τ=0.34 с;

одноручевой режим

Образец: раствор ламиктала в метаноле,

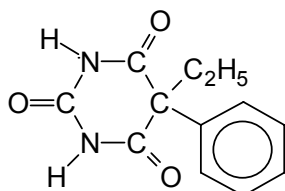
100 мкг/мл

Объем пробы: 4 мкл

Фенобарбитал*

Люминал*, Adonal, Aephenal, Barbenyl, Barbinal, Barbiphen, Dormiral, Gardenal, Lepinal, Luminal, Phenemal, **Phenobarbital***, Phenobarbitone, Sedonal, Sevenal, Somonal и др.

* Международные непатентованные названия, принятые ВОЗ (МНН)

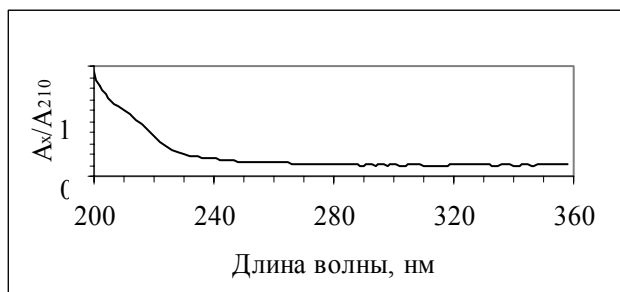


ММ 232.23

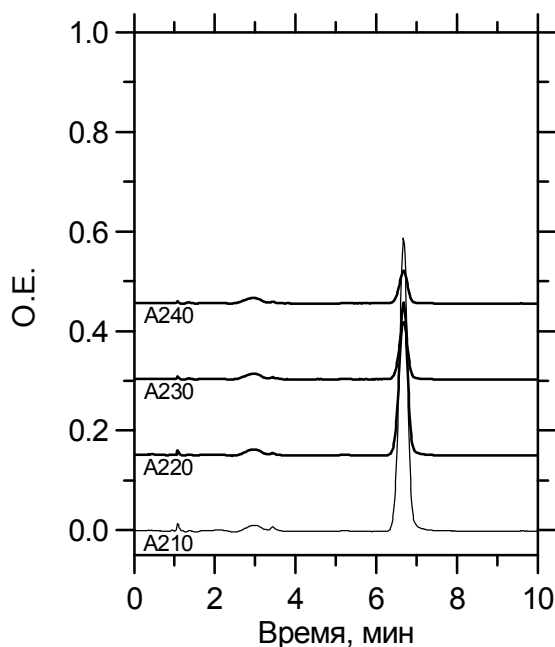
pK_a 7.2

Терапевтическая концентрация – 10 - 40 (50) мкг/мл

Токсическая концентрация – 30 мкг/мл



Спектральное отношение, $R=S_x/S_{210}$		
220	230	240
0,522	0,195	0,110



Колонка: Ø2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюенты: А- 0.2 М LiClO₄, pH 3;

Б- CH₃CN

Подвижная фаза: 20%Б 10 мин

Скорость потока: 150 мкл/мин

Температура колонки: 40°C

Детектор: 210, 220, 230, 240 нм; τ=0.34 сек;

однолучевой режим

Образец: раствор фенобарбитала в

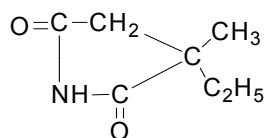
метаноле, 100 мкг/мл

Объем пробы: 4 мкл

Этосуксимид*

Асамид*, Суксилеп*, Ронтон*, Пикнолепсин*, Aethosuximid, Asamid, Ethymal, Remalin, Petinimid, Pyknolepsin, Succimal, Suxilep, Zarontin и др.

* Международные непатентованные названия, принятые ВОЗ (МНН)

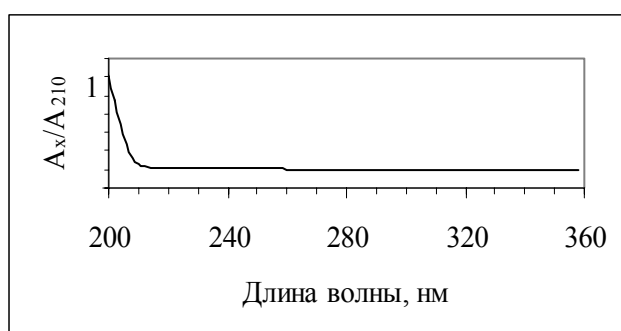


ММ 141.2

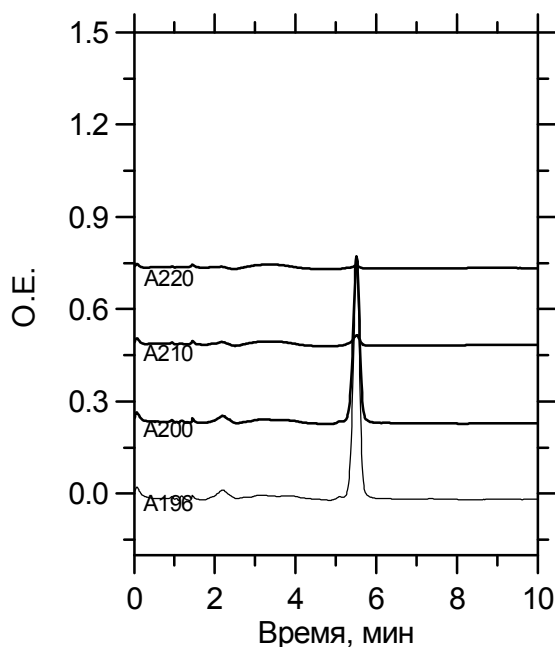
pK_a 9.3

Терапевтическая концентрация – 30-100 мкг/мл

Токсическая концентрация – 100 мкг/мл



Спектральное отношение, R=S _x /S ₁₉₆		
200	210	220
0,711	0,049	0,015



Колонка: Ø2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18

Элюенты: А- 0.2 М LiClO₄, pH 3;

Б- CH₃CN

Подвижная фаза: 10%Б 10 мин

Скорость потока: 150 мкл/мин

Температура колонки: 40°C

Детектор: 196, 200, 210, 220 нм; τ=0.34 сек;
однолучевой режим

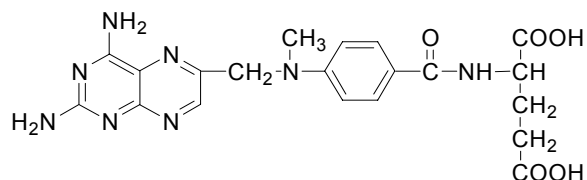
Образец: раствор этосуксимида в метаноле,
100 мкг/мл

Объем пробы: 2 мкл

Метотрексат*

Amethopterin, Methopterine, **Methotrexate***, Methylaminopterinum

* Международные непатентованные названия, принятые ВОЗ (МНН)



ММ 454.5

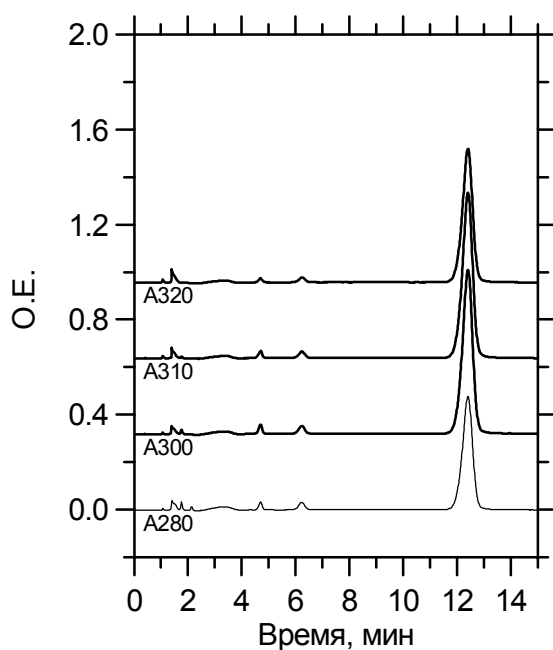
рK_a 3.36; 4.70; 5.71

Терапевтическая концентр. - 0,23**мкг/мл

Токсическая концентрация - 0,45**мкг/мл



Спектральное отношение, R=S _x /S ₃₀₀		
280	310	320
0,691	1,006	0,814

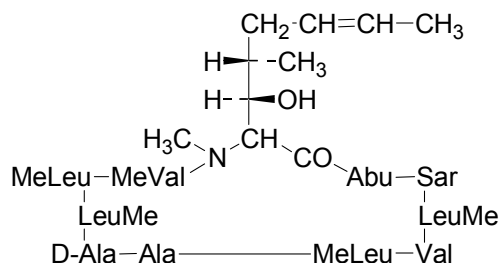
**Колонка:** Ø2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18**Элюенты:** А- 0.2 М LiClO₄, pH 3;**Б-** CH₃CN**Подвижная фаза:** 10%Б 10 мин**Скорость потока:** 150 мкл/мин**Температура колонки:** 40°C**Детектор:** 280, 300, 310, 320 нм; τ=0.34 с;
однолучевой режим**Образец:** раствор метотрексата в воде,
500 мкг/мл**Объем пробы:** 2 мкл

** Значения указаны для высокодозной терапии, через 48 ч после начала инфузии МТХ

Циклоспорин А*

Сандиммун, Cyclosporin, Cyclosporin A, Sandimmun

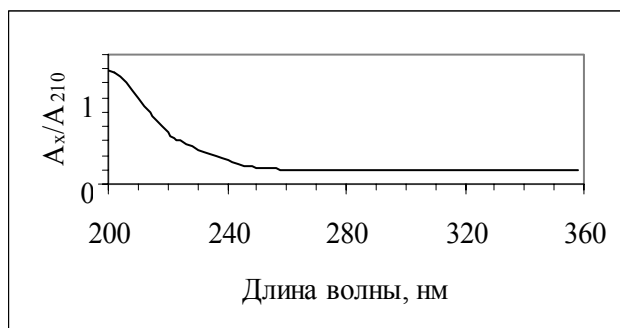
* Международные непатентованные названия, принятые ВОЗ (МНН)



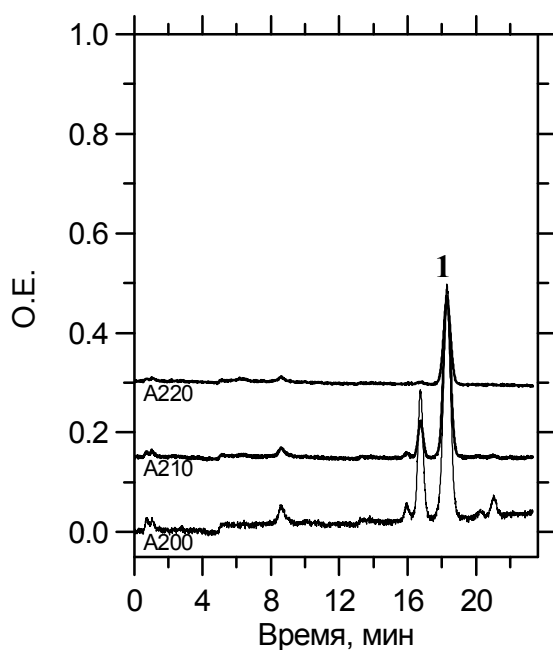
ММ 1203

Терапевтическая концентрация – 0,1-0,4 мкг/мл

Токсическая концентрация – 0,4 мкг/мл



Спектральное отношение, $R=S_x/S_{200}$	
210	220
0,704	0,353

**Колонка:** Ø2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18**Элюенты:** А- 0.2 М LiClO₄, pH 3;Б- CH₃CN**Градиент:** линейный, 2500 мкл от 50%Б до 80%Б, 1000 мкл 80%Б**Скорость потока:** 150 мкл/мин**Температура колонки:** 70°C**Детектор:** 200, 210, 220 нм; τ=0.34 сек; однолучевой режим**Образец:** раствор циклоспорина А в ацетонитриле, 100 мкг/мл

1 – циклоспорин А

Объем пробы: 10 мкл

Результаты определения противосудорожных препаратов
в сыворотке крови пациентов.
Депакин (вальпроевая кислота).

Пациент	Дата анализа	Возраст, лет	Вес, кг	Суточная доза, мг	Содержание вальпроевой кислоты в сыворотке крови, мкг/мл
1	2	3	4	5	6
ОБ-386	15.05.98	7	24	750	66±10
ОБ-387	15.05.98	4	16	300	33±7
ОБ-388	22.05.98	2	12	600	10±3
ОБ-389	29.05.98	2	14	400	90±11
ОБ-390	29.05.98	12	51	900	68±10
ОБ-391	25.06.98	12	40	900	30±7
ОБ-392	2.07.98	7 мес.		300	30±7
ОБ-393	8.07.98	7	28	600	42±8
ОБ-394	8.07.98	1 мес.	4	60	20±5
ОБ-395	13.08.98		28	400	16±4
ОБ-396	13.08.98	1,5	12	225	45±8
ОБ-397	13.08.98	10	29	1000	53±10
ОБ-398	20.08.98	1	10	300	63±10
ОБ-399	20.08.98	14	54	1200	66±10
ОБ-400		12	36	1200	91±11
ОБ-401	20.08.98	8	29	450	32±7
ОБ-402	27.08.98	4	22	650	31±7
ОБ-403	27.08.98	3 мес.	4 кг	50	37±8
ОБ-404	17.09.98	1,5 г	13	300	19±5
ОБ-405	8.10.98	8	28	900	65±10
ОБ-406	8.10.98	12	28	1200	81±11
ОБ-407	12.11.98	2	14	250	13±3
ОБ-408	26.11.98	4	16	600	72±10
ОБ-409	15.12.98	12	45	1000	24±5
ОБ-410	24.12.98	2	14	250	57±10
ОБ-411	14.01.99	4	30	200	32±7
ОБ-412	14.01.99	8		600	56±10
ОБ-413	14.01.99		30	850	33±7
ОБ-414	21.01.99		8	100	21±5
ОБ-415	21.01.99	5 мес.	8	250	31±7
ОБ-416	21.01.99		10	350	33±7
ОБ-417	21.01.99	12		1200	33±7
ОБ-418	4.02.99	8 мес.	7	100	17±4
ОБ-419	4.02.99	13	35	750	107±12

Депакин (вальпроевая кислота). Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-420	11.02.99	4	19	450	77±9
ОБ-421	11.02.99	7 мес.	7,5	150	23±4
ОБ-422	11.02.99	6 мес.	7,5	600	43±7
ОБ-423	25.02.99	1	10	250	38±6
ОБ-424	25.02.99	3	15	400	24±5
ОБ-425	4.03.99	9 мес.	7	200	70±9
ОБ-426	1.04.99	11 мес.	11	300	56±10
ОБ-427	8.04.99	14	38	900	58±10
ОБ-428	15.04.99	12	63	600	31±7
ОБ-429	15.04.99	11 мес.	7	350	51±10
ОБ-430	29.04.99	5	19	500	11±4
ОБ-431	29.04.99	5 мес.	9 кг	Ацидипрол,450	12±4
ОБ-432	6.05.99	13	47	Ацидипрол,450	25±5
ОБ-433	6.05.99	13	47	Ацидипрол,450	22±5
ОБ-434	13.05.99	7	19	Ацидипрол,600	65±10
ОБ-435	13.05.99	1	10	600	93±12
ОБ-436	13.05.99	1	9	150	13±3
ОБ-437	13.05.99	34	50	600	20±5
ОБ-438	24.06.99	14	53	900	91±12
ОБ-439	8.07.99	14	46	600	48±10
ОБ-440	15.07.99	1	10	Ацидипрол, 450	53±10
ОБ-441	23.07.99	14	48	800	39±8
ОБ-442	23.07.99	12	41	600	7±2
ОБ-443	9.09.99	5	23	400	64±10
ОБ-444	17.09.99	9	34	600	48±9
ОБ-445	17.09.99	7	22	700	67±10
ОБ-446	14.10.99	1,5	12	800	45±8
ОБ-447	21.10.99	5	20	300	22±5
ОБ-448	21.10.99	8	28	600	66±10
ОБ-449	21.10.99	12	52	800	16±5
ОБ-450	21.10.99	6	12	100	20±5
ОБ-451	28.10.99	8	28	900	68±10
ОБ-452	28.10.99		48	900	40±8
ОБ-453	13.11.99	5	20	450	39±8
ОБ-454	25.11.99	5	22	900	36±8
ОБ-455	2.12.99	4	16	600	45±8
ОБ-456	16.12.99	6	19	300	40±8
ОБ-457	16.12.99	4	15	400	15±3
ОБ-458	16.12.99	4	18	300	44±8
ОБ-459	01.06.00	13	46	900	36±8

Депакин (вальпроевая кислота). Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-460	08.06.00	8 мес.	9 кг	300	96±10
ОБ-461	08.06.00	1,5	11	200	30±7
ОБ-462	15.06.00	11 мес.	8	300	84±10
ОБ-463	15.06.00	13	52	900	81±10
ОБ-464	22.06.00	7 мес.		520	13±3
ОБ-465	29.06.00	7 мес.	6	600	98±10
ОБ-466	06.07.00	13	58	400	21±5
ОБ-467	13.07.00	15	51	600	44±8
ОБ-468	13.07.00	13	45	1200	99±10
ОБ-469	27.07.00	8	19	750	109±12
ОБ-470	27.07.00	14	51	900	35±8
ОБ-471	27.07.00		23	600	66±10
ОБ-472	27.07.00	16	48	600	10±3
ОБ-473	03.08.00	3	14	400	78±10
ОБ-474	03.08.00			200	13±3
ОБ-475	10.08.00	3	14	600	67±10
ОБ-476	10.08.00	4 мес.	7	150	27±5
ОБ-477	17.08.00	7	24	450	13±3
ОБ-478	17.08.00		20	600	62±10
ОБ-479	17.08.00	1,5	10	300	47±8
ОБ-480	24.08.00	9	25	600	25±5
ОБ-481	24.08.00	10	29	950	18±4
ОБ-482	24.08.00	5	16	300	31±5
ОБ-483	24.08.00	1,5	10	200	8±3
ОБ-484	31.08.00	3,5	35	450	31±5
ОБ-485	31.08.00	15	62	900	35±5
ОБ-486	07.09.00	12	46	600	56±8
ОБ-487	07.09.00	7	23	900	18±4
ОБ-488	21.09.00	13	53	600	47±8
ОБ-489	21.09.00	1,5	10	250	68±10
ОБ-490	21.09.00	1,5	9	500	36±7
ОБ-491	21.09.00	2	13	150	81±10
ОБ-492	12.10.00		12	900	70±10
ОБ-493	12.10.00	3,5	16	400	36±7
ОБ-494	02.11.00	10	25	600	65±10
ОБ-495	09.11.00	7	28	300	36±7
ОБ-496	09.11.00		11	300	40±7
ОБ-497	07.12.00		10	500	10±3
ОБ-498	07.12.00	17	59	600	7±2
ОБ-499	14.12.00	14		900	28±6

Депакин (вальпроевая кислота). Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-500	21.12.00	2,5	14	400	33±7
ОБ-501	04.01.01	9		900	55±9
ОБ-501	18.01.01	15	40	1250	94±10
ОБ-502	18.01.01	12	54	825	45±7
ОБ-503	25.01.01	14	49	600	32±6
ОБ-504	08.02.01	12	36	450	21±5
ОБ-505	15.03.01	5 мес.	6,5	250	32±6
ОБ-506	29.03.01	15	75	600	27±5
ОБ-507	05.04.01	9	39	1200	36±6
ОБ-508	05.04.01	9	25	1500	29±5
ОБ-509	05.04.01	10	25	Конвульсофин, 300	26±5
ОБ-510	05.04.01	9	27	Конвульсофин, 900	46±7
ОБ-511	12.04.01	7	20	600	107±12
ОБ-512	12.04.01	5	20	300	58±9
ОБ-513	19.04.01	9	32	700	65±10
ОБ-514	26.04.01	7	20	600	65±10
ОБ-515	26.04.01	9	34	1350	81±10
ОБ-515	03.05.01	11	33	900	99±11
ОБ-516	17.05.01	11	30	Конвульсофин, 300	22±5
ОБ-517	17.05.01	7	18	500	21±5
ОБ-518	17.05.01	6	22	900	30±5
ОБ-518	17.05.01	2,5	12	400	27±5
ОБ-519	17.05.01	2,5	11	500	38±5
ОБ-520	17.05.01	3	15	400	27±5
ОБ-521	17.05.01	12	30	1200	70±10
ОБ-522	24.05.01	14	15	1500	52±8
ОБ-523	24.05.01	7	26	750	8±2
ОБ-524	24.05.01	7	24	600	53±8
ОБ-525	31.05.01	3	16	750	45±8
ОБ-526	20.06.01	13	70	900	18±3
ОБ-527	20.06.01	14	30	600	36±5
ОБ-528	21.06.01	11 мес.	7	480	71±10
ОБ-529	28.06.01	8	22	600	68±10
ОБ-530	05.07.01	6	26	300	25±5
ОБ-531	19.07.01	3	13	500	38±6
ОБ-532	26.07.01	6	23	900	66±10
ОБ-533	08.08.01	8	27	1200	65±10
ОБ-534	08.08.01	2		300	58±9
ОБ-535	08.08.01	2		300	22±5
ОБ-536	16.08.01	7	25	600	44±7

Депакин (вальпроевая кислота). Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-537	16.08.01	7		600	28±5
ОБ-538	29.08.01	14	63	900	53±8
ОБ-539	29.08.01	9	21	750	125±12
ОБ-540	13.09.01	8	37	900	58±9
ОБ-541	13.09.01		7	200	67±10
ОБ-542	13.09.01		14	225	17±3
ОБ-543	20.09.01			900	83±10
ОБ-544	20.09.01	15		600	28±5
ОБ-545	20.09.01	10		600	79±10
ОБ-546	27.09.01	14	45	Конвульсофин, 600	32±5
ОБ-547	27.09.01	10	27	Конвульсофин, 550	39±6
ОБ-548	11.10.01	14	50	300	10±3
ОБ-549	11.10.01	5	15	200	24±5
ОБ-550	18.10.01	16	59	1000	18±3
ОБ-551	18.10.01		34	1500	35±6
ОБ-552	25.10.01	10	32	900	61±8
ОБ-553	01.11.01	5	18	1050	66±8
ОБ-554	01.11.01	13		600	22±5
ОБ-555	01.11.01			600	37±5
ОБ-556	01.11.01			600	24±5
ОБ-557	06.12.01	3		400	44±7
ОБ-558	06.12.01	4		300	19±3
ОБ-559	13.12.01	14	50	1100	7±2
ОБ-560	13.12.01	13	30	900	44±7
ОБ-561	13.12.01	7	22	450	30±5
ОБ-562	24.01.02	5	17	900	81±10
ОБ-563	31.01.02	1	11	400	64±10
ОБ-564	14.02.02	1,5	12	300	15±3
ОБ-565	14.02.02			450	17±3
ОБ-566	21.02.02	8	84	300	30±5
ОБ-567	28.02.02	15	47	500	89±10
ОБ-568	07.03.02	17	65	1250	23±5
ОБ-569	14.03.02	31	7	600	63±10
ОБ-570	21.03.02	15	39	1300	54±9
ОБ-571	21.03.02	6	25	300	36±6
ОБ-572	21.03.02	11	34	300	35±6
ОБ-573	28.03.02	8	22	600	82±10
ОБ-574	28.03.02	11	39	1000	68±10
ОБ-575	04.04.02	14	50	300	35±5
ОБ-576	11.04.02	1,5	11	200	63±10

Депакин (вальпроевая кислота). Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-577	18.04.02	1	9	150	41±6
ОБ-578	25.04.02	3	11	300	35±5
ОБ-579	25.04.02	1	10	225	7±2
ОБ-580	25.04.02	8	28	900	9±2
ОБ-581	16.05.02	13	43	900	52±6
ОБ-582	29.05.02	2		200	65±10
ОБ-583	06.06.02	6	25	600	130±12
ОБ-584	13.06.02	12	63	1200	54±6
ОБ-585	27.06.02	2	13	250	13±3
ОБ-586	08.07.02	5	21	600	46±6 (12-00)
					68±10 (18-00)
					41±6 (24-00)
					20±4 (6-00)
ОБ-587	18.07.02	7		750	68±10
ОБ-588	18.07.02	1,5		400	14±3
ОБ-589	08.08.02	10	26	900	35±7
ОБ-590	08.08.02	8	25	700	54±9
ОБ-591	08.08.02	2	10	600	65±10
ОБ-592	16.08.02	6	20	600	75±10
ОБ-593	22.08.02	15	69	900	35±7
ОБ-594	09.09.02	15		600	16±3
ОБ-595	10.09.02	10		1000	130±12
ОБ-596	24.10.02	27	62	800	10±3
ОБ-597	14.11.02	15	49	1250, хроно, прием 21-00	94±10 (8-45)
					39±7 (14-00)
					51±8 (23-00)
ОБ-598	21.11.02	27	62	800	44±7
ОБ-599	02.12.02	3	15	900	79±10
ОБ-600	02.12.02		20	600	65±10
ОБ-601	05.12.02	4	18	450	35±7
ОБ-602	05.12.02	15	52	750	20±4
ОБ-603	19.12.02		36	Хроно, 600, Прием 6-00	44±8 (10-00)
					36±7 (21-00)
					47±8 (80-30)
ОБ-604	26.12.02	6	28	Хроно, 500	30±6 (19-00)
					79±10 (8-00)
ОБ-605	06.02.03	4 мес.	6,5	Сироп, 450	114±12
ОБ-606	06.02.03	3	15	Хроно, 750	20±4
ОБ-607	06.02.03	9	31	Хроно, 750	26±5
ОБ-608	13.02.03	11	33	1000	28±5

Депакин (вальпроевая кислота). Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-609	21.02.03	12	51	Хроно, 500	23±5
ОБ-610	21.02.03	9	15	Хроно, 750	21±5
ОБ-611	20.03.03	8	24	750	107±12
ОБ-612	27.03.03	10	37	900	35±7
ОБ-613	27.03.03	16	60	Хроно, 750	28±5
ОБ-614	03.04.03	12	56	Хроно, 500	66±10
ОБ-615	30.04.03	2	12	Сироп, 200	16±3
ОБ-616	15.05.03	5	18	900	31±5
ОБ-617	22.05.03	7	20	Хроно, 750	42±7
ОБ-618	04.06.03	10	39	Хроно, 1100	45±7
ОБ-619	04.06.03	13	48	Хроно, 1000	84±10
ОБ-620	03.07.03	3	17	200	42±7
ОБ-621	17.07.03	10	25	Хроно, 1000	57±8
ОБ-622	17.07.03		32	1500	69±10
ОБ-623	22.07.03	8	22	300	16±3
ОБ-624	22.07.03	12		300	18±3
ОБ-625	31.07.03	8	29	Хроно, 300	28±5
ОБ-626	07.08.03	2,5	14	600	32±5
ОБ-627	07.08.03	13	42	Хроно, 1500	28±5
ОБ-628	14.08.03	16	56	Хроно, 1500	29±5
ОБ-629	23.10.03	14		Хроно, 500	16±3
ОБ-630	21.11.03	9	28	Хроно, 500	45±8

Карбамазепин.

Пациент	Дата анализа	Возраст, лет	Вес, кг	Суточная доза, мг	Содержание карбамазепина в сыворотке крови, мкг/мл
1	2	3	4	5	6
ОБ-163	11.11.97	10	30	300	4.0±0.3
ОБ-164	28.11.97	9	23	100	н/д
ОБ-165	05.12.97	9	23	100	н/д
ОБ-166	18.12.97	7	20	100	6.3±0.5
ОБ-167	30.12.97	2.5		300	7.2±0.6
ОБ-168	15.01.98	13	45	400	3.2±0.3
ОБ-169	15.01.98	2.5		800	7.8±0.6
ОБ-170	21.01.98	7	20	400	6.6±0.5
ОБ-171	21.01.98	2.5		800	12.0±0.8
ОБ-172	27.01.99	2.5		800 (Карбасан)	8.0±0.6
ОБ-173	21.01.98	12	33	300	6.4±0.5
ОБ-174	29.01.98	6		400	11.2±0.8
ОБ-175	06.03.98	15		800	6.6±0.5
ОБ-176	17.03.98	2.5		800(Карбасан)	8.3±0.6
ОБ-177	17.03.98	4	15	150	5.3±0.4
ОБ-178	17.03.98	8	22	200	4.0±0.3
ОБ-179	17.03.98	5	15	250	7.4±0.6
ОБ-180	25.03.98	6	18	200	3.7±0.3
ОБ-181	25.03.98			150	4.9±0.4
ОБ-182	07.04.98	8	23	800 (Карбасан)	8.5±0.6
ОБ-183	07.04.98	5	20	400 (Карбасан)	8.5±0.6
ОБ-184	08.05.98	3	17	800 (Карбасан)	13.1±0.9
ОБ-185	15.05.98	4	21	250 (Карбасан)	5.1±0.4
ОБ-186	15.05.98	3	17	800 (Карбасан)	10.2±0.7
ОБ-187	22.05.98	15	57	200	5.4±0.4
ОБ-188	22.05.98	1	9	50	8.7±0.6
ОБ-189	11.06.98	12	45	200	4.9±0.4
ОБ-190	19.06.98	8	28	200	9.2±0.6
ОБ-191	25.06.98	11	32	300	5.6±0.4
ОБ-192	02.07.98	4	20	60	4.5±0.4
ОБ-193	30.07.98	11	43	700	7.7±0.7
ОБ-194	30.07.98	7	38	600	7.7±0.7
ОБ-195	06.08.98	3	12	100	3.4±0.3
ОБ-196	13.08.98	7	38	650	10.2±0.7
ОБ-197	20.08.98	3,5	13	200	11.5±0.8
ОБ-198	27.08.98	1	10	50	8.0±0.7

Карбамазепин. Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-199	08.10.98	14	58	600	10.3±0.7
ОБ-200	22.10.98	4 мес.	10	50	5.4±0.4
ОБ-201	12.11.98	4 мес.	6,2	100	5.5±0.4
ОБ-202	26.11.98		63	400	3.6±0.3
ОБ-203	15.12.98	7	20	200	5.3±0.4
ОБ-204	15.12.98	7	22	200	9.7±0.7
ОБ-205	14.01.99	2 мес.	6	100	5.8±0.4
ОБ-206	28.01.99	5	24	200	7.8±0.7
ОБ-207	28.01.99	1,5	13	100	2.5±0.2
ОБ-208	04.02.99		13	600	8.0±0.7
ОБ-209	11.02.99	2,5	11	150	2.0±0.2
ОБ-210	25.02.99	5	25	300	8.6±0.7
ОБ-211	04.03.99	6	18	100	4.3±0.4
ОБ-212	04.03.99	6	22	400	10.7±0.7
ОБ-213	04.03.99	3	15	300	7.6±0.7
ОБ-214	25.03.99	6	22	100	3.0±0.2
ОБ-215	01.04.99	3	13	100	4.1±0.3
ОБ-216	01.04.99	9		200	3.1±0.2
ОБ-217	08.04.99	3	13	150	3.4±0.2
ОБ-218	15.04.99	8	23	250	6.0±0.5
ОБ-219	15.04.99	2 мес.	3	80	2.3±0.2
ОБ-220	06.05.99	7	33	300	5.1±0.4
ОБ-221	17.06.99	16	69	400	5.5±0.4
ОБ-222	24.06.99	8		250	2.8±0.2
ОБ-223	24.06.99	5	24	200	4.3±0.4
ОБ-224	01.07.99	11	48	500	7.6±0.7
ОБ-225	08.07.99	9	27	200	6.1±0.5
ОБ-226	08.07.99	14	48	300	5.4±0.5
ОБ-227	22.07.99	6	21	400	6.8±0.7
ОБ-228	22.07.99	10	30	400	10.0±0.7
ОБ-229	22.07.99	14	60	800	9.6±0.7
ОБ-230	22.07.99			200	12±0.8
ОБ-231	02.09.99	10	32	300	4.2±0.4
ОБ-232	23.09.99	10	34	400	6.5±0.5
ОБ-233	30.09.99	5	16	150	5.4±0.5
ОБ-234	30.09.99	3		150	2.0±0.2
ОБ-235	30.09.99	9	32	200	6.2±0.5
ОБ-236	01.10.99	1,5 мес.	5	25	6.9±0.7
ОБ-237	14.10.99	5	20	100	4.5±0.4
ОБ-238	14.10.99	15	52	200	6.5±0.7

Карбамазепин. Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-239	21.10.99	12	48	500	6.8±0.7
ОБ-240	21.10.99	5	20	200	6.0±0.5
ОБ-241	21.10.99		24	350	7.2±0.7
ОБ-242	28.10.99	5	16	300	11±0.7
ОБ-243	05.11.99		22	400	6.5±0.7
ОБ-244	05.11.99		53	400	2.9±0.3
ОБ-245	20.11.99	2,5	12	200	10±0.7
ОБ-246	02.12.99	1,5	10	250	8.0±0.7
ОБ-247	02.12.99	4	16	200	6.5±0.7
ОБ-248	09.12.99	8	26	400	9.7±0.7
ОБ-249	09.12.99	13	46	200	5.6±0.5
ОБ-250	16.12.99	6	22	100	4.4±0.4
ОБ-251	16.12.99	4	16	300	6.7±0.6
ОБ-252	16.12.99	7	25	200	6.0±0.5
ОБ-253	14.01.99	2 мес.	6	100	5.8±0.5
ОБ-254	28.01.99	5	25	200	7.8±0.7
ОБ-255	01.06.00	14	47	200	6.6±0.6
ОБ-256	01.06.00	7	20	100	4.2±0.3
ОБ-257	01.06.00	1,5	3,8	81	17±1.2
ОБ-258	08.06.00	11	47	600	8.8±0.6
ОБ-259	08.06.00	3	11	150	7.7±0.7
ОБ-260	15.06.00	6		300	13±0.9
ОБ-261	22.06.00	14		300	7.5±0.7
ОБ-262	29.06.00	15	57	300	5.7±0.5
ОБ-263	27.07.00	13	53	300	7.6±0.7
ОБ-264	27.07.00	23	65	600	18±1.2
ОБ-265	03.08.00	10		300	6.7±0.6
ОБ-266	03.08.00	12	39	300	11±0.7
ОБ-267	10.08.00	8	20	300	14±1
ОБ-268	10.08.00	5	24	200	11±0.7
ОБ-269	17.08.00	15		500	9.4±0.6
ОБ-270	17.08.00	5	20	400	9.2±0.6
ОБ-271	31.08.00	1,5 мес.	3,3	50	11.1±0.7
ОБ-272	14.09.00	4	19	200	2.9±0.3
ОБ-273	14.09.00	2 мес.	3,7	75	3.3±0.3
ОБ-274	05.10.00	11	31	400	7.1±0.6
ОБ-275	05.10.00	4	17	250	6.4±0.6
ОБ-276	19.10.00	1,5	13	150	3.1±0.3
ОБ-277	19.10.00	10	24	400	8.4±0.7
ОБ-278	26.10.00	5	28	350	11.5±0.7

Карбамазепин. Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-279	02.11.00	3.5	11	100	6.7±0.6
ОБ-280	02.11.00	10	30	500	7.7±0.7
ОБ-281	09.11.00	8		100	2.9±0.3
ОБ-282	09.11.00	4	15	300	5.0±0.4
ОБ-283	21.12.00	5	20	400	7.6±0.6
ОБ-284	21.12.00	1	9	200	7.1±0.6
ОБ-285	25.01.01	12	36	200	4.9±0.4
ОБ-286	08.02.01	1,9	12	200	5.5±0.4
ОБ-287	15.03.01	8	20	300	5.2±0.4
ОБ-288	15.03.01	13	49	300	4.4±0.3
ОБ-289	15.03.01	4	16	180	2.1±0.2
ОБ-290	22.03.01	14	56	300	4.2±0.3
ОБ-291	29.03.01	10	33	450	3.3±0.3
ОБ-292	05.04.01	13	45	500	6.4±0.6
ОБ-293	05.04.01	16	94	400	3.2±0.3
ОБ-294	05.04.01	7	11	300	7.2±0.6
ОБ-295	06.04.01	13	46	400	5.9±0.6
ОБ-296	12.04.01	7	29	400	4.6±0.4
ОБ-297	17.05.01	8	29	250	7.5±0.6
ОБ-298	05.07.01	13	43	300	6.3±0.5
ОБ-299	05.07.01	10	51	200	4.1±0.3
ОБ-300	05.07.01	14	50	500	5.1±0.4
ОБ-301	05.07.01	9	22	50	1.4±0.2
ОБ-302	05.07.01	11	40	200	7.0±0.6
ОБ-303	19.07.01	9	24	200	2.0±0.2
ОБ-304	19.07.01	9 мес	8	40	2.9±0.3
ОБ-305	08.08.01	12		600	6.4±0.5
ОБ-306	16.08.01	4	12	100	3.5±0.3
ОБ-307	29.08.01	14	75	600	4.7±0.3
ОБ-308	29.08.01	4	15	400	3.8±0.3
ОБ-309	13.09.01	11	31	400	4.9±0.4
ОБ-310	13.09.01		44	400	5.1±0.4
ОБ-311	27.09.01	2	12	150	3.1±0.3
ОБ-312	27.09.01	10	34	200	4.4±0.3
ОБ-313	11.10.01	5	15	300	1.7±0.2
ОБ-314	25.10.01	1	13	100	4.6±0.3
ОБ-315	25.10.01	5		100	6.4±0.5
ОБ-316	15.11.01			100	1.6±0.2
ОБ-317	22.11.01			250	3.1±0.3
ОБ-318	22.11.01			500	3.1±0.3

Карбамазепин. Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-319	22.11.01			500	3.6±0.3
ОБ-320	29.11.01		41	600	5.0±0.4
ОБ-321	17.01.02	4		100	3.3±0.3
ОБ-322	17.01.02	16	80	400	4.8±0.4
ОБ-323	24.01.02	14	48	600	5.2±0.4
ОБ-324	31.01.02	9	33	200	1.9±0.2
ОБ-325	14.02.02	11	34	600	6.4±0.5
ОБ-326	14.03.02	47	14	200	Ниже Пр0
ОБ-327	11.04.02	10 мес.	9	150	2.4±0.3
ОБ-328	11.04.02	9	23	300	2.9±0.3
ОБ-329	11.04.02	3	16	400	2.8±0.3
ОБ-330	18.04.02		25	300	5.7±0.5
ОБ-331	16.05.02	8	26	400	4.7±0.4
ОБ-332	23.05.02	7	25	600	5.6±0.5
ОБ-333	29.05.02	3	17	100	1.9±0.2
ОБ-334	11.06.02	3	14	210	4.6±0.4
ОБ-335	13.06.02	10	35	400	1.4±0.2
ОБ-336	27.06.02	12	50	200	2.5±0.2
ОБ-337	27.06.02	8	31	150	3.5±0.3
ОБ-338	27.06.02	14	58	500	5.2±0.4
ОБ-339	04.07.02	6	20	100	2.5±0.2
ОБ-340	04.07.02	3	14	150	6.0±0.5
ОБ-341	08.07.02	13	69	600	2.5±0.2
ОБ-342	18.07.02	15		600	5.4±0.5 (19-40)
					4.1±0.3 (8-00)
ОБ-343	18.07.02	13		300	2.9±0.2 (8-00)
					4.6±0.3 (10-00)
ОБ-344	18.07.02	6		500	3.1±0.2
ОБ-345	18.07.02	13		800	6.9±0.6
ОБ-346	25.07.02	9	28	400	2.9±0.3
ОБ-347	01.08.02	8	22	200	5.8±0.4
ОБ-348	01.08.02	12	39	200	2.6±0.2
ОБ-349	16.08.02	3	18	300	2.8±0.2
ОБ-350	22.08.02	9	37	300	2.0±0.2
ОБ-351	02.09.02	17	104	800	5.7±0.4
ОБ-352	26.09.02	7	30	200	2.1±0.2
ОБ-353	10.10.02	12	34	600	5.8±0.4
ОБ-354	10.10.02	10	34	200	3.0±0.2
ОБ-355	10.10.02	13	60	200	1.8±0.2
ОБ-356	18.10.02	15	44	500	2.5±0.2

Карбамазепин. Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-357	31.10.02	6	20	500	6.8±0.6
ОБ-358	31.10.02	9	32	400	2.9±0.2
ОБ-359	02.12.02	12	43	200	2.8±0.2
ОБ-360	19.12.02		16	400	5.0±0.4
ОБ-361	26.12.02	14	59	400	6.1±0.5
ОБ-362	16.01.03	12	40	500-Рет	5.5±0.4
ОБ-363	13.02.03	7	22	300	2.6±0.2
ОБ-364	13.02.03	2	13	150	2.4±0.2
ОБ-365	20.03.03	12	34	400	4.8±0.4
ОБ-366	27.03.03		20	200-Рет.	1.9±0.2
ОБ-367	03.04.03	18	64	200	2.9±0.2
ОБ-368	10.04.03	3,5		200	4.9±0.3
ОБ-369	24.04.03	14	60	400	2.3±0.2
ОБ-370	08.05.03	3,5	15	225	6.4±0.5
ОБ-371	26.05.03	3	16	200	5.8±0.4
ОБ-372	18.06.03			200	2.4±0.2
ОБ-373	10.07.03			200	2.9±0.2
ОБ-374	10.07.03	3		400	2.4±0.2
ОБ-375	17.07.03	4	14	150	4.4±0.3
ОБ-376	31.07.03	8	22	200	3.5±0.3
ОБ-377	31.07.03	4	17	200	2.6±0.2
ОБ-378	07.08.03	12	41	200	5.2±0.4
ОБ-379	04.10.03	14	65	600-Рет	8.1±0.7
ОБ-380	23.10.03	6	29	200-Р	3.4±0.2
ОБ-381	30.10.03	13	44	800	7.6±0.6
ОБ-382	07.11.03	10		400-Рет.	6.2±0.5
ОБ-383	07.11.03	10	32	300-Рет	7.7±0.6
ОБ-384	21.11.03	10	44	600	6.6±0.5
ОБ-385	28.11.03	5	14	250-Рет.	4.2±0.3

Фенобарбитал и бензонал.

Пациент	Дата анализа	Возраст, лет	Вес, кг	Суточная доза, мг	Содержание фенобарбитала в сыворотке крови, мкг/мл
1	2	3	4	5	6
ОБ-1	17.10.97	14		100	14±1.4
ОБ-2	17.10.97	5		50	6.0±0.3
ОБ-3	17.10.97	2,8		20	6.5±0.3
ОБ-4	17.10.97	13		100	28±1.7
ОБ-5	17.10.97	5		50	3.8±0.3
ОБ-6	23.10.97	12		100	7.4±0.4
ОБ-7	23.10.97	11		100	13±1.2
ОБ-8	23.10.97	11		100	8.0±0.4
ОБ-9	29.10.97				20±1.2
ОБ-10	29.10.97				5.1±0.2
ОБ-11	29.10.97				10±1
ОБ-12	29.10.97				17.7±
ОБ-13	29.10.97				21±1.2
ОБ-14	11.11.97	9	37	80	15±1.2
ОБ-15	21.11.97	14		100	25±1.5
ОБ-16	21.11.97	13		200	29±1.8
ОБ-17	28.11.97	2,8		30	12±1.2
ОБ-18	28.11.97	9	23	50	13±1.3
ОБ-19	28.11.97	1,7		15	5.0±0.2
ОБ-20	28.11.97	3		30	5.4±0.2
ОБ-21	05.12.97	9	23	50	8.9±0.5
ОБ-22	05.12.97	13	39	100	19±1.2
ОБ-23	05.12.97	6	19	50	9.1±0.3
ОБ-24	05.12.97	13	45	100	16±1.2
ОБ-25	05.12.97	13	43	100	25±1.5
ОБ-26	12.12.97	7	20	100	21±1.2
ОБ-27	12.12.97	14	73,5	100	18±1.2
ОБ-28	12.12.97	12	43	100	23±1.5
ОБ-29	12.12.97	12	41,5	100	27±1.5
ОБ-30	12.12.97	1,5			4.1±0.2
ОБ-31	12.12.97	6	19	50	8.0±0.5
ОБ-32	12.12.97	13	43	100	37±2
ОБ-33	12.12.97	9	31	80	37±2
ОБ-34	18.12.97	12	41,5	100	20±1.2
ОБ-35	18.12.97	11	43	100	19±1.2
ОБ-36	18.12.97	8	34	80	17±1.5
ОБ-37	18.12.97	9	21	50	7.5±0.5

Фенобарбитал и бензонал. Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-38	18.12.97	3	10,5	30	4.1±0.2
ОБ-39	18.12.97	0,3	5	3	2.8±0.2
ОБ-40	18.12.97	7	20	100	32±2
ОБ-41	18.12.97	11	31	100	20±1.2
ОБ-42	18.12.97	13	36	100	25±1.5
ОБ-43	15.01.98	14	55	50	16±1.2
ОБ-44	15.01.98	7	42	80	4.6±0.2
ОБ-45	15.01.98	7		100	25±1.5
ОБ-46	15.01.98	5		50	19±1.2
ОБ-47	21.01.98	9		100	13±0.6
ОБ-48	21.01.98	7		70	22±1.3
ОБ-49	21.01.98	14	36	100	20±1.2
ОБ-50	21.01.98			100	20±1.2
ОБ-51	21.01.98	7	19	100	15±1.2
ОБ-52	21.01.98			60	15±1.2
ОБ-53	21.01.98			30	5.3±0.2
ОБ-54	21.01.98			100	16±1.2
ОБ-55	21.01.98			70	25±1.5
ОБ-56	21.01.98	0,6	7	30	11±0.6
ОБ-57	27.01.98	7	19	100	17±1.2
ОБ-58	27.01.98	12	33	100	13±0.6
ОБ-59	27.01.98	6		100	16±1.2
ОБ-60	29.01.98	12	35	100	20±1.2
ОБ-61	03.02.98	12	56	50	10±0.5
ОБ-62	03.02.98	12	33	100	24±1.4
ОБ-63	03.02.98	6	33		24±1.4
ОБ-64	03.02.98	9	35	100	23±1.4
ОБ-65	03.02.98	8	18	100	14±1.3
ОБ-66	17.03.98	1	8	10	19±1.5
ОБ-67	17.03.98	4	18	40	8.7±0.5
ОБ-68	25.03.98	7	21	50	20±1.5
ОБ-69	25.03.98	4	41	100	16±1.4
ОБ-70	25.03.98	7	28	50	3.0±0.2
ОБ-71	13.04.98	10	31	80	5.9±0.5
ОБ-72	17.04.98	8	28	80	9.2±0.5
ОБ-73	17.04.98	7	24	60	11±1
ОБ-74	06.05.98	7	26	40	6.3±0.6
ОБ-75	15.05.98	7	25	80	9.9±1
ОБ-76	22.05.98	5	18	100	7.3±0.6
ОБ-77	22.05.98	21	65	100	9.1±0.6

Фенобарбитал и бензонал. Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-78	29.05.98	6	19	50	12±1
ОБ-79	29.05.98	4	16	40	5.5±0.5
ОБ-80	29.05.98	10	30	50	9.4±0.5
ОБ-81	05.06.98			20	4.7±0.5
ОБ-82	11.06.98	12	54	100	18±1.5
ОБ-83	11.06.98			Бензонал, 150	37±2
ОБ-84	11.06.98	7	40	70	12.3±1.1
ОБ-85	25.06.98	1	10	10	2.2±0.2
ОБ-86	02.07.98	7	22	40	8.5±0.6
ОБ-87	02.07.98	12		100	2.7±0.2
ОБ-88	08.07.98	9	24	70	15±1.2
ОБ-89	08.07.98	10	28	100	24±1.5
ОБ-90	30.07.98	9	27	80	15±1.2
ОБ-91	30.07.98	4	19	70	14±1.2
ОБ-92	30.07.98	7	22	60	10±0.6
ОБ-93	30.07.98	9	34	60	7.8±0.5
ОБ-94	06.08.98	14	50	100	14±1.3
ОБ-95	06.08.98	9	35	90	8.9±0.6
ОБ-96	13.08.98	8	24	80	8.7±0.6
ОБ-97	27.08.98	12	31	100	8.3±0.6
ОБ-98	17.09.98	5	21	50	8.1±0.6
ОБ-99	08.10.98	30	52	Бензонал, 200	18±1.5
ОБ-100	22.10.98	14	58	Бензонал, 300	18±1.5
ОБ-101	22.10.98	16	68	100	12±1.2
ОБ-102	26.11.98	14	48	100	12±1.2
ОБ-103	24.12.98	8	26	80	14±1.3
ОБ-104	14.01.99	5		60	6.7±0.6
ОБ-105	14.01.99			100	12±1.2
ОБ-106	28.01.99	5	17	70	24±1.5
ОБ-107	28.01.99	1	11	10	2.7±0.2
ОБ-108	28.01.99	10	35	100	6.2±0.5
ОБ-109	28.01.99	3		Бензонал, 50	9.5±0.7
ОБ-110	04.02.99		18	50	12±1.1
ОБ-111	04.02.99	4	18	50	19±1.3
ОБ-112	04.02.99	16	64	100	13±1.1
ОБ-113	11.02.99	10	30	100	15±1.2
ОБ-114	25.02.99	3	15	Бензонал, 75	26±1.5
ОБ-115	04.03.99	17	64	100	11±1.1
ОБ-116	11.03.99	3,5			10±0.6
ОБ-117	18.03.99	3	12	10	11±1.1

Фенобарбитал и бензонал. Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-118	18.03.99	6	24	50	2.8±0.2
ОБ-119	25.03.99	14		100	15±1.2
ОБ-120	15.04.99	6	20	100	13±1.1
ОБ-121	15.04.99	13	57	100	14±1.2
ОБ-122	29.04.99	0,7	9	7	2.8±0.2
ОБ-123	20.05.99	14	62	100	10±0.6
ОБ-124	20.05.99		55	100	7.8±0.5
ОБ-125	27.05.99			50	6.4±0.5
ОБ-126	27.05.99			10	2.6±0.2
ОБ-127	17.06.99	9	20	70	16±1.3
ОБ-128	17.06.99	13	38	200	24±1.5
ОБ-129	08.07.99	10	29	90	16±1.3
ОБ-130	22.07.99	3,5	17	Бензонал, 100	25±1.5
ОБ-131	02.09.99	10	38	100	9.4±0.6
ОБ-132	02.09.99	10	29	Бензонал, 150	10±0.6
ОБ-133	23.09.99	12	37	Бензонал, 200	17±1.3
ОБ-134	14.10.99	2,3	11	20	4.2±0.2
ОБ-135	14.10.99	11	27	100	14±1.2
ОБ-136	05.11.99		25	Бензонал, 100	15±1.2
ОБ-137	13.11.99	11	24	70	9.8±0.6
ОБ-138	20.11.99	14	35	100	15±1.2
ОБ-139	25.11.99	12	27	60	13±1.2
ОБ-140	25.11.99	11	30	100	10±0.6
ОБ-141	09.12.99	3	20	30	7.7±0.6
ОБ-142	01.06.00	10	29	30	5.4±0.5
ОБ-143	15.06.00	7	23	70	8.1±0.6
ОБ-144	06.07.00	9	29	70	9.0±0.6
ОБ-145	06.07.00	7	25	70	11±0.6
ОБ-146	13.07.00	2,6	13	20	4.0±0.2
ОБ-147	03.08.00	12	30	Бензонал, 50	10±0.6
ОБ-148	14.09.00	1,2	10	20	4.7±0.5
ОБ-149	21.09.00	5	20	Бензонал, 100	11±1.2
ОБ-150	12.10.00	14	58	80	10±0.6
ОБ-151	12.10.00	6	19	60	7.6±0.6
ОБ-152	11.01.01	9	38	70	15±1.2
ОБ-153	29.03.01	11		100	3.1±0.2
ОБ-154	28.06.01	1,9	11	Бензонал, 100	27±1.8
ОБ-155	05.07.01	13		100	19±1.5
ОБ-156	26.07.01	12	49	80	15±1.5
ОБ-157	08.08.01	12	37	Бензонал, 200	12±1.2

Фенобарбитал и бензонал. Продолжение.

1	2	3	4	5	6
ОБ-158	08.08.01	16		100	24±1.5
ОБ-159	21.02.02	0,7	8	30	12±1.2
ОБ-160	28.03.02	16	57	Бензонал, 200	22±1.5
ОБ-161	11.04.02	16		100	9.4±0.6
ОБ-162	01.08.02	10	26	90	14±1.3

Комплексная терапия.

Пациент	Дата анализа	Возраст, лет	Вес, кг	Фенобарбитал		Карбамазепин		Депакин	
				Доза препарата в сутки, мг	Концентрация в сыворотке, мкг/мл	Доза препарата в сутки	Концентрация в сыворотке, мкг/мл	Доза препарата в сутки	Концентрация в сыворотке, мкг/мл
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ОБ-631	28.01.99	10		Б., 150	15±1.4	Д., 117	9.9±0.6		
ОБ-632	11.02.99	5	18	50	13±1.4	Д, 150	19±1.2		
ОБ-633	25.02.99	14	50			400	7.0±0.6	500	47±7
ОБ-634	1.04.99		65	100	7.1±0.6	С., 750	53±2		
ОБ-635	1.04.99	9	28	100	11±1.2	400	3.5±0.3		
ОБ-636	15.04.99	9	25	С., 500	95±5				
ОБ-637	15.04.99	9		С., 500	45±3				
ОБ-638	6.05.99	12	52	70	17±1.4	500	4.1±0.3		
ОБ-639	13.05.99	14		100	23±1.5	100	4.9±0.4		
ОБ-640	24.06.99	11	43	Б., 50	3.9±0.2	Д., 117	Ниже ПрО		
ОБ-641	24.06.99	12	52	75	8.8±0.6	Д.,117	4.2±0.3		
ОБ-642	23.07.99	8	30			200		600	14±3
ОБ-643	26.08.99	10	32	50	13±1.4			500	42±7
ОБ-644	30.09.99	8	30	80	14±1.4	400	9.3±0.8		
ОБ-645	20.11.99	4	18	50	5.0±0.5	200	6.2±0.5		
ОБ-646	25.11.99	10	34	80	12±1.2	400	4.4±0.4		
ОБ-647	2.12.99	3	15	40	8.7±0.6	С., 250	11.4±0.7		
ОБ-648	9.12.99	14	61			400	8.6±0.7	500	22±5
ОБ-649	16.12.99	7	22	50	17±1.4	200	2.9±0.2		

Комплексная терапия. Продолжение.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ОБ-650	16.12.99	15	69	100	26±1.5	С., 1250	98±5		
ОБ-651	10.08.2000	12	66	100	20±1.5	100	12.4±0.8	750	21±5
ОБ-652	10.08.2000	3 мес.	6	Л., 2.5	0.8±0.1			150	146±14
ОБ-653	17.08.2000	7	25	Б., 20 (отмена)	2±0.2	150	4.8±0.3		
ОБ-654	24.08.2000	11	29	50	10±0.6			1200	34±7
ОБ-655	24.08.2000		25			200	2.3±0.2	250	8±2
ОБ-656	31.08.2000	1,5 мес.	3,5			50	11.0±0.8		
ОБ-657	14.09.2000	7	23	Л., 12	0.5±0.1	200	3.1±0.2	1500	85±10
ОБ-658	21.12.2000	3	19			500	7.9±0.6	900	18±3
ОБ-659	23.02.01	15	40	Л., 50	2.4±0.2	Д., 100	7.1±0.5		
ОБ-660	22.03.01	9	25	Л., 6.25	0.7±0.1			1500	Ниже ПрО
ОБ-661	29.03.01	7		Л., 12,5	1.0±0.1	200	5.3±0.4	1800	49±8
ОБ-662	12.04.01	6	15	80	31±2	200	2.0±0.2		
ОБ-663	12.04.01	5	16	50	7.1±0.6	С., 0.125	22±1		
ОБ-664	24.05.01	2,5	15	Л., 8	1.1±0.1	300	9.8±0.8		
ОБ-665	24.05.01	6 мес.	7,5	Л., 12.5	1.0±0.1	170	9.1±0.8		
ОБ-666	31.05.01	9	20	Л., 50	1.3±0.1	600	11.3±0.9		
ОБ-667	21.06.01	7	22	Л., 2.5	0.6±0.1			900	85±10
ОБ-668	28.06.01	9	20	Л., 50	0.6±0.1	600	10.3±0.9		
ОБ-669	16.08.01	15	46	50	38±2	Г., 500			
ОБ-670	16.08.01	16	76			700	4.3±0.3	1250	23±5
ОБ-671	20.09.01	8		Л., 12.5	1.1±0.1	200	4.6±0.3	1800	89±10
ОБ-672	01.11.01	16		100	19±1.3	400	4.2±0.3		
ОБ-673	22.11.01	6		Б., 125	11±0.6	550			

Комплексная терапия. Продолжение.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ОБ-674	28.12.01	6	17	Л., 25	4.0±0.3			1000	105±12
ОБ-675	17.01.02	3				270	4.1±0.3	600	66±10
ОБ-676	24.01.02	12	50	Л., 100	2.1±0.2	600	8.3±0.7		
ОБ-677	14.02.02	13	56	50	14±1.2	200	2.8±0.2		
ОБ-678	04.04.02	11	34	С., 500	64±4				
ОБ-679	25.04.02	6	28	Г., 250	20±1	Л., 125	5.5±0.4	900	8±2
ОБ-680	13.06.02	6	29	Л., 175	4.8±0.3	С, 500	31±2		
ОБ-681	27.06.02	11	37	Б., 50	7.1±0.6	800	3.4±0.2		
ОБ-682	27.06.02	8	31	Б., 50	8.0±0.6	150	3.5±0.2		
ОБ-683	04.07.02	16	41	Л., 100	1.8±0.2	Д., 200	25±2		
ОБ-684	08.07.02	8	31			300	3.5±0.2	450	13±2
ОБ-685	18.07.02	9				200	3.6±0.3	600	27±5
ОБ-686	18.07.02	8				400	4.3±0.3	600	44±7
ОБ-687	08.08.02	8	25	Л., 12.5	2.3±0.2			900	83±10
ОБ-688	31.10.02	43	81	Л., 100	0.6±0.1	400	4.7±0.3		
ОБ-689	27.03.03	4	17	Л., 5	1.0±0.1			900	40±7
ОБ-690	22.05.03	5	18	Л., 15	2.1±0.1			600	58±7
ОБ-691	17.06.03	9	34			400	2.1±0.2	800	37±7
ОБ-692	17.07.03	9		Л., 75	1.1±0.1	400	5.8±0.4		
ОБ-693	07.08.03	10	35	Л., 18	1.2±0.1	400	7.9±0.6	1800	47±7
ОБ-694	07.08.03	2	11	Л., 5	0.6±0.1			450	26±5
ОБ-695	27.08.03	16	41	Л., 25	1.9±0.2			750	53±8
ОБ-696	09.10.03	10	28			600	7.9±0.6	750	12±2
ОБ-697	23.10.03	2	14	Л., 12,5	2.6±0.2			1000	104±12

Комплексная терапия. Продолжение.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ОБ-698	23.10.03	8	50			400	7.1±0.6	2000	45±7
ОБ-699	23.10.03	2	12	Л., 10	1.6±0.2				
ОБ-700	30.10.03	7	32			400		500	
ОБ-701	07.11.03	5	16			100	3.2±0.2	450	24±5
ОБ-702	07.11.03	4	11	Л., 25	2.4±0.2			300	61±10
ОБ-703	28.11.03	14	44	Л., 75	1.5±0.2	1200	10.3±0.7		

Б бензонал

Г – гексамидин

Д - дифенин

С – суксилеп (этосуксимид)

Л - ламиктал