

Стратегия выбора аналитического метода при определении остаточных лекарственных препаратов в биологических жидкостях

Стрельникова Е.Г., Карцова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет

Контроль остаточного содержания лекарственных препаратов стероидной и нестероидной природы в биологических жидкостях крайне важен при оценке эффективности проводимой лекарственной терапии. При выборе аналитического метода приходится учитывать следующие обстоятельства.

Подобие химических структур природных и лекарственных стероидов обуславливает и близость их хроматографических и электрофоретических характеристик, поэтому селективность разделения этих соединений как в режиме ВЭЖХ, так и в капиллярном электрофорезе (КЭ) недостаточна (слайд 1).

Содержание этих компонентов в биологических жидкостях крайне мало (на уровне нг/мл), поэтому для их определения необходимы высокочувствительные методы (слайд 2).

Наибольшее распространение для решения подобных задач получили иммунологические и хроматографические методы.

Первые – имеют принципиальные ограничения: за один аналитический цикл можно определять лишь одно соединение.

Перспективным для решения поставленной задачи, наряду с ВЭЖХ, мог бы оказаться метод капиллярного электрофореза, эффективность которого существенно выше (слайд 3). Однако, чувствительность УФ-детектирования – ниже, что затрудняет количественное определение остаточных лекарственных препаратов в биологических жидкостях.

Прежде чем предложить возможные пути выбора аналитического метода, нами была проведена серия экспериментов с использованием следующих хроматографических и электрофоретических методов: высокоэффективная жидкостная и тонкослойная хроматография, включая мицеллярный вариант; капиллярный зонный электрофорез и мицеллярная электрокинетическая хроматография (слайд 4).

Снижения пределов обнаружения аналитов можно было бы достичь при использовании различных вариантов *on-line* концентрирования, а увеличения селективности разделения – при введении в состав элюента или рабочего буфера так называемых организованных сред (мицелл поверхностно-активных веществ, циклодекстринов (ЦД), краун-эфиров, цикламов), способных взаимодействовать с разделяемыми компонентами (слайд 5).

Сам термин «*организованные среды*» в последние годы широко используется и является ключевым понятием супрамолекулярной химии, в основе которой – образование комплексов по типу «гость-хозяин» с участием невалентных взаимодействий.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) подразделяются на анионные, катионные, цвиттерионные и нейтральные (слайд 6).

Циклодекстрины могут быть как немодифицированными, так и модифицированными, зачастую приобретая при этом заряд (слайд 7).

Стратегия выбора метода анализа определяется несколькими факторами (слайд 8). Первое – природа аналита. Второе – возможность индивидуального анализа препаратов в биологических жидкостях, т.е. не перекрывают ли компоненты матрицы пробы сигнал, соответствующий лекарству. И третье, предел обнаружения компонента должен быть ниже, чем содержание препарата в пробе.

Нами предложена блок-схема (слайд 9), отражающая стратегию выбора и пути оптимизации электрофоретического или хроматографического метода при определении лекарственных препаратов в биологических жидкостях в зависимости от природы аналита: ионогенный или нейтральный, гидрофобный или гидрофильный.

Модельной системой для реализации логики запланированного эксперимента – а именно, увеличения селективности разделения и снижения пределов обнаружения, явилась смесь близких по химической структуре гидрофобных природных гормонов и синтетических стероидов, последние используются в качестве лекарственных препаратов, способных как устранить нарушения стероидогенеза, так и вызвать нежелательные эффекты (слайд 10), а также гидрофильных нестероидных противовоспалительных средств (слайд 11).

Решение проблем состояло в следующем (слайд 12): введение заряженного сульфо- β -циклодекстрина в состав рабочего буфера позволило бы определять нейтральные стероиды методом капиллярного зонного электрофореза, а ПАВ, формирующих дополнительную мицеллярную фазу, повлияло бы на селективность разделения в режимах как жидкостной, так и мицеллярной электрокинетической хроматографии.

Добиться снижения пределов обнаружения в капиллярном электрофорезе можно с использованием различных вариантов *on-line* концентрирования (стэкинга или свипинга) (слайд 13).

Основной принцип стэкинга заключается в различии электропроводностей раствора пробы и буфера, электропроводность последнего больше. Компоненты пробы ускоряются в более высоком поле матрицы образца и концентрируются на границе с буферным электролитом.

В основе свипинга лежит концентрирование аналитов псевдостационарной фазой (мицеллами), которая проникает в зону образца не содержащей мицелл, причем проводимости растворов образца и буфера сопоставимы.

Предложенные варианты оптимизации были проверены нами, прежде всего, в режиме ВЭЖХ на модельной смеси гидрофобных эндо- и экзогенных стероидов (слайд 14). Введение мицелл додецисульфата натрия (ДДСН) в подвижную фазу привело к разделению синтетического лекарственного препарата – дексаметазона и природного стероидного гормона – 11-дегидро-кортикостерона. Однако для другой пары (кортизол-преднизолон) этого достичь не удалось.

Более успешным оказалось использование в составе подвижной фазы макроцикла с каркасной структурой – β -циклодекстрина, позволившего полностью отделить лекарственные препараты от природных гормонов и при этом сократить вдвое общее время анализа (слайд 15).

Рассчитаны константы комплексообразования в системе макроцикл-стероидный гормон. Максимальное значение – для наиболее гидрофильного – преднизолона. Минимальное – для дексаметазона (слайд 16), что обусловлено более слабыми взаимодействиями внешних гидроксильных групп макроцикла за счет присутствия в молекуле дексаметазона метильного заместителя.

Наряду с ВЭЖХ, нами предложен вариант экспресс-контроля стероидных лекарств и диагностически важных эндогенных гормонов в режиме высокоэффективной тонкослойной хроматографии с денситометрическим детектированием (слайд 17). Предел обнаружения составил 100 нг/мл. Оптимальным оказался вариант двукратного элюирования с использованием систем, представленных на слайде.

Однако для внедрения подобной схемы анализа в практику клинической медицины желательно было бы уменьшить содержание органических растворителей в составе подвижной фазы.

Такую роль мог бы выполнить водно-мицеллярный ДДСН, что было проверено нами на примере лекарственного препарата преднизолон, как наиболее гидрофильного и прочнее удерживаемого на силикагеле (слайд 18). Оптимальный вариант – 15 мМ детергента был реализован при определении наиболее диагностически важных гормонов (кортизол, кортизон) и обычно применяемых лекарственных препаратов (кортизон ацетат, преднизолон, дексаметазон).

Тем не менее, добавки некоторых количеств органических растворителей в мицеллярную водную фазу приводят к росту эффективности, что показано на примерах диэтилового эфира и ацетонитрила при определении кортизола, кортизона и дексаметазона (слайд 19). Указанные стероиды – важнейшие компоненты, содержание которых необходимо контролировать при диагностике и лечении одного из достаточно распространенных эндокринных заболеваний – синдром Иценко-Кушинга. При использовании ацетонитрила достигается лучшее разрешение и большая эффективность.

Следующий этап – выяснение возможностей электрофоретического определения компонентов модельной смеси. Нейтральный характер стероидов не позволяет решить эту задачу методом КЗЭ – они движутся вместе с электроосмотическим потоком (слайд 20).

Необходимо было использовать либо заряженные добавки в составе рабочего электролита, либо другой режим – мицеллярную электрокинетическую хроматографию (МЭКХ), позволяющую определять ионные и нейтральные аналиты.

Изучены обе возможности и учтены результаты хроматографических экспериментов, а именно: способность гидрофобных аналитов образовывать комплексы с циклодекстринами и проявлять высокое сродство к мицеллам.

Введение заряженного сульфо-ЦД изменило электрофоретические подвижности компонентов и привело к их разделению за исключением пары кортизол-кортизон (слайд 20). Были предприняты различные попытки решить эту проблему, и лишь добавка 4 М мочевины в эту систему привела к полному разделению аналитов с максимальной эффективностью (слайд 21).

В отличие от зонного варианта, в МЭКХ подвижность стероидов обеспечивают отрицательно заряженные мицеллы.

В режиме обращенной полярности (ввод пробы с катодного конца) аналиты, распределяясь между раствором буферного электролита и псевдостационарной фазой (мицеллы ДДСН), движутся против ЭОП по направлению к аноду (слайд 22).

Использование мочевины и в этом случае позволило резко сократить время анализа, и разделить все компоненты с высокой эффективностью, т.е. этот вариант, по сравнению с зонным является предпочтительным (слайд 23).

Установленные закономерности при хроматографическом и электрофоретическом определении смеси гидрофобных стероидных лекарств позволили прогнозировать режим разделения гидрофильных нестероидных противовоспалительных препаратов.

В режимах ВЭТСХ и зонного КЭ (ионные аналиты) с использованием заряженного сульфо-β-ЦД и макроциклов с гидрофильной полостью удалось подтвердить или опровергнуть индивидуальность ряда фармацевтических препаратов (слайд 24).

Таким образом, выяснив доминирующие факторы при хроматографическом и электрофоретическом разделении, была отработана пробоподготовка реальных объектов с использованием жидкостной и твердофазной экстракций (слайд 25).

Следует отметить, что в случае ВЭЖХ достаточно *off-line* концентрирования, однако электрофоретический метод анализа не позволяет достичь таких величин без проведения он-лайн концентрирования (различных модификаций стэкинга и свипинга) для снижения пределов обнаружения аналитов (слайд 26).

Нами были изучены следующие варианты: стэкинг с обращенно-мигрирующими мицеллами с усилением поля, высокопроводящей матрицей, свипинг, а также свипинг с добавкой мочевины или β-ЦД в матрицу пробы.

Количественной оценкой эффективности концентрирования является фактор концентрирования. Лучшие результаты при концентрировании стероидов получены в случае свипинга с добавкой 5 мМ β-ЦД в матрицу образца. Предел детектирования составил 5 нг/мл.

Результаты по оптимизации условий разделения природных гормонов и синтетических лекарств и их количественному определению позволили получить

оценочные характеристики методов, используемых в данной работе, что выявило преимущества и ограничения каждого из них (слайд 27). Кроме того, обсуждаемые методы могут выступать в качестве референтных по отношению друг к другу при анализе биологических объектов.

На слайде 28 представлены результаты анализа реального объекта (эндокринное нарушение – синдром Иценко-Кушинга), полученные различными методами (ВЭЖХ, тонкослойной и мицеллярной электрокинетической хроматографией). Данные по кортизолу достоверно не отличаются друг от друга.

Метод ОФ ВЭЖХ может быть успешно использован для оценки эффективности так называемой дексаметазоновой пробы, т.е. возможности подавления этим препаратом биосинтеза кортизола и кортизона (слайд 29).

На слайде 30 представлен анализ сыворотки крови донора, принимающего противовоспалительные средства – парацетамол, аспирин.

Разработанные методы нашли широкое применение в практике клинической медицины для выявления следующих заболеваний при проведении функциональных проб лекарственными стероидами: болезнь и синдром Иценко-Кушинга, синдром поликистозных яичников, вирильный синдром, врожденная гиперплазия коры надпочечников, т.е. возможна ранняя диагностика эндокринных заболеваний (слайд 31).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов были сделаны следующие выводы:

1. Добавка циклодекстрина в подвижную фазу увеличивает селективность разделения гидрофобных стероидов (ОФ ВЭЖХ): возможно одновременное определение природных гормонов и остаточных стероидных лекарств
2. Использование «организованных сред» (заряженных циклодекстринов, мицелл ПАВ) позволяет определять нейтральные аналиты методом капиллярного электрофореза
3. Применение различных вариантов *on-line* концентрирования позволяет снижать пределы обнаружения минорных компонентов до 5 нг/мл методом капиллярного электрофореза.

Спасибо за внимание.