

УДК 615.07:543.544.5.068.7

ПРЕДКОЛОНКА С ГЕТЕРОПОВЕРХНОСТНЫМ СОРБЕНТОМ ДЛЯ ВЭЖХ АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

¹Богословский С.Ю., ²Сердан А.А., ³Нестеренко П.Н.

¹Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана,
Москва, e-mail: b.su@bmstu.ru;

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва;

³Университет Тасмании, Хобарт, Тасмания, Австралия

Показана возможность применения короткой хроматографической колонки длиной 2,0 см и внутренним диаметром 4,0 мм с гетероповерхностным сорбентом для прямого определения теофиллина и кофеина в плазме крови. Особенностью гетероповерхностного сорбента является отсутствие удерживания объемных белковых компонентов из пробы, в то время как определяемые низкомолекулярные лекарственные препараты удерживаются согласно их гидрофобности. Использование такой колонки позволяет производить определение кофеина и теофиллина в фильтратах плазмы крови, исключив продолжительные по времени и трудоемкие стадии предварительной подготовки пробы, включая осаждение белков. Рабочий диапазон *pH* элюента при работе с гетероповерхностным сорбентом составляет от 4,5 до 7,5. При продолжительной работе колонки в элюентах с невысокими (менее 10%) содержаниями ацетонитрила или метанола необходимо принимать меры, предотвращающие биodeградацию сорбента. Хроматографическая колонка допускает ввод образцов нефилтрованной плазмы крови общей массой до 50 мг в пересчёте на сухое вещество введённой плазмы. Характеристики удерживания кофеина и теофиллина при этом практически не изменяются: фактор удерживания для теофиллина $k = 4,0 \pm 0,1$ и для кофеина $k = 8,5 \pm 0,4$ в элюенте состава 0,02 М гидроортофосфат натрия (*pH* = 6,0) – ацетонитрил (90:10).

Ключевые слова: количественное определение, высокоэффективная жидкостная хроматография, гетероповерхностный сорбент, альбумин, кофеин, теофиллин

COLUMN PACKED WITH HETEROSURFACE ADSORBENT FOR DIRECT CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF PHARMACEUTICALS IN BIOLOGICAL FLUIDS

¹Bogoslovskiy S.Y., ²Serdan A.A., ³Nesterenko P.N.

¹Bauman Moscow State Technical University, Moscow, e-mail: b.su@bmstu.ru;

²MSU, Moscow;

³University of Tasmania, School of Physical Sciences, Hobart, Tasmania, Australia

The application of a short column 20×4,0 mm ID packed with restricted access media (RAM) adsorbent for direct determination of theophylline and caffeine in blood plasma is demonstrated. The feature of RAM-adsorbent is connected with absence of the retention of bulky proteins from human blood, while low molecular mass pharmaceutical are retained according to their hydrophobicity. The use of such column allows the determination of caffeine and theophylline in human plasma after filtration without the unwanted time and labour consuming sample preparation procedures, such as precipitation of proteins. RAM-sorbent can be used in eluent *pH* range between 4,5–7,5, and the range of acceptable concentration of organic modifier in eluent is limited only by the required eluent strength. Special precautions should be undertaken to prevent biodegradation of RAM-adsorbent during prolonged use of the column with eluent containing a small (less than 10%) concentration of acetonitrile or methanol. Total sample loading of blood plasma up to 50 mg in terms of dry substance can be applied to the column, after which some column regeneration is required. The retention of caffeine and theophylline have not changes after regeneration: the retention factor for theophylline $k = 4,0 \pm 0,1$ and caffeine $k = 8,5 \pm 0,4$ with 0,02 M Na₂HPO₄ (*pH* = 6,0) – acetonitrile (90:10) as eluent.

Keywords: quantitative determination, high-performance liquid chromatography, heterosurface adsorbent, albumin, caffeine, theophylline

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является основным методом определения содержания лекарственных препаратов в биологических жидкостях человека, в частности для терапевтического мониторинга транквилизаторов, нейролептиков и антидепрессантов. Применение обычных обращенно-фазовых сорбентов (ОФС) для прямого, без отделения биологических макромолекул, ВЭЖХ-анализа биологических

жидкостей невозможно из-за необратимой адсорбции белков на поверхности гидрофобизованных силикагелей [7]. Поэтому для определения лекарственных препаратов требуется предварительное удаление белков из анализируемых проб, что, как правило, является трудоёмкой операцией, существенно повышающей стоимость анализа и увеличивающей его продолжительность в два-пять раз. Ускорение такого анализа возможно за счёт использования различных

видов автоматизированной проточной твердофазной микроэкстракции [7] или эксклюзионной хроматографии [6].

Более простым и эффективным методом преодоления указанных трудностей является использование гетероповерхностных сорбентов (ГС) вместо традиционных ОФС. Гетероповерхностные сорбенты получают адсорбционным насыщением поверхности гидрофобного сорбента на основе силикагеля со специально подобранной пористой структурой макромолекулами альбумина, которые затем дополнительно «сшивают» друг с другом [2, 4, 9]. Такая структура поверхностного слоя ГС обеспечивает эксклюзию биологических макромолекул из пробы без разделения и со скоростью, сопоставимой со скоростью подвижной фазы, тогда как для остальных низкомолекулярных компонентов пробы реализуют хроматографическое разделение по одному или нескольким механизмам удерживания. Это позволяет ограничить пробоподготовку простой фильтрацией пробы и осуществлять хроматографический анализ без удаления белков. Однако эффективность колонок с ГС всегда ниже, чем колонок, заполненных ОФС, на основе которого синтезирован ГС, так как защитное покрытие ГС замедляет диффузию низкомолекулярных компонентов проб в поры и из пор сорбента. Из-за того, что гидрофобность сшитых молекул альбумина меньше гидрофобности привитых алкильных групп, время удерживания лекарственных препаратов на ГС, как правило, немного меньше, чем на ОФС. Кроме того, при работе в кислых элюентах с pH ниже 4 протонированные аминогруппы глобул белка на внешней поверхности ГС способны поглощать отрицательно заряженные сорбаты [8]. При правильном выборе геометрических параметров кремнезёмных матриц для ГС доля поверхности, доступная для белковых компонентов проб, не превышает нескольких процентов, поэтому при её экранировании снижение гидрофобности у лучших образцов ГС невелико. Однако поглощение кислых сорбатов при низких pH элюента наблюдается и в этом случае, что делает невозможным их количественное определение.

Проблема определения кислых сорбатов может быть решена за счёт использования хроматографической системы с короткой колонкой, заполненной ГС, переключателя потоков подвижной фазы и стандартной колонки с ОФС. В этом случае при необходимости хроматографирования проб, содержащих кислые сорбаты, сильно кислыми элюентами, отделение белковых компонентов пробы на колонке с ГС производят при $pH > 4$, а разделение на ОФС колонке – при требуемом значении pH , что позволяет из-

бежать поглощения кислых сорбатов ГС.

Использование системы, включающей короткую колонку с ГС вместе с ОФС по схеме «хроматографической лупы» вместо одной колонки с ГС позволяет повысить эффективность разделения целевых компонентов. Во многих случаях такая схема хроматографа позволяет избежать постепенного загрязнения ГС колонки компонентами из анализируемых проб, способных сорбироваться на белковом покрытии ГС, благодаря возможности регенерировать ГС колонки путем обратной промывки с помощью дополнительного насоса, производимой после перевода целевых компонентов на основную ОФС колонку [5].

Цель работы – оценка возможности использования колонки с гетероповерхностным сорбентом на основе алкилкремнезёма, экранированного сшитым альбумином, для прямого определения кофеина и теофиллина в плазме человеческой крови.

Материалы и методы исследования

В качестве матрицы для синтеза ГС использовали кремнезём, модифицированный алкилсиланом по стандартной методике [3]. Исходную кремнезёмную матрицу выбирали так, чтобы ОФС имел узкое распределение пор по размерам с максимумом распределения пор по диаметру около 6 нм. В данной работе использовали фракцию мезопористого силикагеля КСК-Г с размером частиц 5–7 мкм, распределение пор по размерам которого после модифицирования гексадецилдиметилхлорсиланом близко к оптимальному. В соответствии с методикой, изложенной в [4], и уточнениями [1], поверхность кремнезёма активировали, прививали гексаметилсилильные группы, экранировали внешнюю поверхность сорбента человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), после чего глобулы ЧСА сшивали глутаровым альдегидом и восстанавливали азометиновые связи раствором боргидрида натрия. Полученный ГС упаковывали суспензионным способом в колонку из нержавеющей стали длиной 2 см и внутренним диаметром 4 мм. Для хроматографирования использовали градиентный насос Spectra Physics P4000, двухволновой сканирующий УФ-детектор UV2000 фирмы (Thermo Electron Corp., США) и петлевой кран-дозатор «Rheodyne-7125» с петлей объемом 25 мкл. Разделения проводили со скоростью потока подвижной фазы 1 мл/мин, детектирование осуществляли на длине волны 254 нм.

ГС колонку подключали к двухпозиционному крану (рис. 1). В позиции «загрузка» (рис. 1, а) элюент от насоса проходил через первый кран-дозатор и ГС колонку, после которой направлялся в слив. При проведении анализа пробу вводили в систему с помощью петлевого крана-дозатора, белковые компоненты на выходе из колонки удаляли в слив, затем переключали кран из позиции «загрузка» в позицию «ввод» (рис. 1, б), направляя элюент с анализируемыми компонентами пробы на разделение из ГС колонки в аналитическую колонку. После выхода целевых компонентов из колонки её отключали обратным поворотом крана. При этом появлялась возможность промывки предколонки с помощью второго насоса. Схема обратной промывки ГС колонки показана на рис. 2.

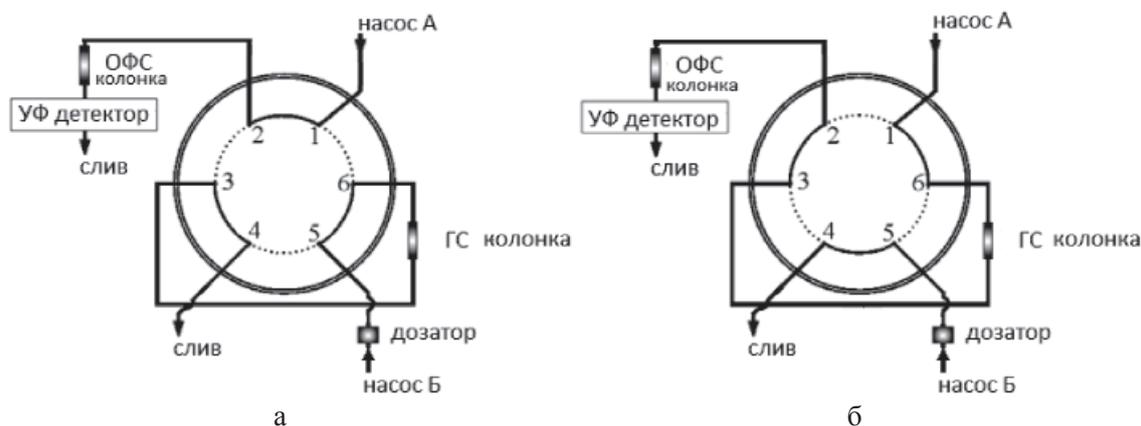


Рис. 1. Схема организации потоков элюентов в режиме отделения белковых компонентов пробы (а) и при анализе целевых компонентов (б)

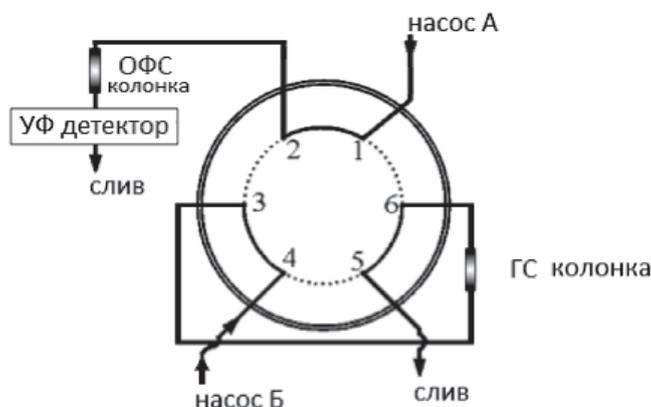


Рис. 2. Схема организации потоков элюентов в режиме обратной промывки ГС колонки

Для оценки инертности поверхности ГС к белкам пробы и определения времени удерживания целевых компонентов на колонке хроматографирование проводили через ГС колонку без ОФС колонки и использовали модельный раствор, приготовленный из физиологического раствора с добавлением человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) до концентрации 10 мг/мл. Детектор подключали непосредственно к ГС колонке.

Модельный раствор вводили в ГС колонку порциями по 10 мкл. Хроматографические испытания проводили с использованием модельной смеси лекарственных препаратов, содержащей бензойную кислоту, теofilлин и кофеин в плазме крови. Фактор удерживания (коэффициент емкости) рассчитывали из отношения приведённого времени удерживания к мёртвому времени:

$$k = t_R/t_M$$

Результаты исследования и их обсуждение

Для оценки качества модифицирования поверхности синтезированного ГС до упаковки в хроматографическую колонку

была измерена адсорбционная ёмкость по ЧСА для трёх сорбентов, синтезированных на основе одного и того же кремнезёма КСК-Г. Для гетероповерхностного сорбента она составила 0,9 мг/г, для исходного ОФС – 24,5 мг/г и для сравнения для сорбента с привитыми диольными группами – 1,1 мг/г. Эти результаты подтверждают инертность доступной для белков проб поверхности ГС, близкую к инертности сорбента с диольными группами, специально синтезированного для разделения биополимеров. Преимуществом ГС при его использовании в колонках для анализа гидрофобных лекарственных препаратов является существенно больший в сравнении с гидрофильными сорбентами фактор удерживания анализируемых лекарственных веществ и высокая селективность, позволяющая эффективно отделять белки пробы.

При первоначальном использовании колонки с гетероповерхностным сорбентом наблюдали наличие небольшой сорбционной

ёмкости по ЧСА, суммарно равной 50 мкг для колонки 20×4 мм, проявлявшееся в постепенном насыщении ГС колонки при повторных вводах 20 мкл модельного раствора. Размер хроматографического ЧСА на выходе из ГС колонки составлял 3% при первом вводе, 14% при втором и 74% для третьего, а начиная с пятого ввода, процент обнаружения был более 97%. Этот эффект наблюдался лишь при первом использовании и, вероятно, вызван незначительным повреждением защитного белкового слоя на поверхности сорбента при упаковке предколонки суспензионным методом.

Большое значение в условиях хроматографирования с прямым вводом анализируемых проб имеет стабильность защитного слоя ГС. Для оценки этого параметра использовали модельная смесь с содержанием теофиллина 2,7 мг/мл и кофеина 1,0 мг/мл в нефилтрованной плазме человеческой крови. Пробы вводили по 10 мкл. Хроматографирование осуществляли в изократическом режиме с использованием элюента 0,02 М гидроортофосфата натрия ($pH = 6,0$) – ацетонитрил (90:10). По мере ввода проб давление на входе в предколонку возрастало практически линейно вплоть до ввода 60-й пробы. Так, после первых 30 проб давление на входе в предколонку возросло на 50%, при вводе следующих 30 проб оно удвоилось относительно первоначального. Далее давление возрастало медленнее, и после ввода 90 проб (50 мг в пересчёте на сухое вещество введённой нефилтрованной плазмы суммарно) превышало начальное в 2,25 раза. После обратной промывки ГС колонки метанолом давление снизилось до 120% от первоначального. Характеристики удерживания кофеина и теофиллина практически не изменялись во время эксперимента. Фактор удерживания составил для теофиллина $k = 4,0 \pm 0,1$ и для кофеина $k = 8,5 \pm 0,4$.

Вероятно, повышение давления на входе в ГС колонку связано с адсорбцией белков пробы на входном фильтре, поэтому желательно производить предварительную фильтрацию плазмы крови перед её вводом в хроматографическую систему. Однако при использовании схемы с обратной промывкой допустимо использование нефилтрованной плазмы для анализа. В пересчёте на сухое вещество до регенерации ГС колонки можно суммарно ввести до 50 мг белков плазмы во всех образцах.

Полученные зависимости удерживания аналитов кислой и основной природы от pH , ионной силы и концентрации органического растворителя в элюенте подобны для ГС и ОФС [8]. Увеличение содержа-

ния ацетонитрила в элюенте 0,02 М фосфат натрия– ацетонитрил ($pH = 6,5$) от 10 до 15% уменьшает факторы удерживания теофиллина и кофеина на ГС на треть; при дальнейшем увеличении содержания ацетонитрила до 20% факторы удерживания практически не изменяются. Снижение концентрации ацетонитрила до 5% увеличивает фактор удерживания теофиллина и кофеина в 2 и 3,3 раза соответственно вследствие усиливающегося неспецифического взаимодействия этих молекул с привитыми гексадецильными группами ГС. Таким образом, изменение концентрации ацетонитрила в элюенте позволяет оптимизировать время выхода целевых компонентов пробы и добиться их отделения от белковых компонентов за приемлемое время. При длительной эксплуатации ГС колонки с элюентом, содержащим менее 10% ацетонитрила, необходимо предпринимать меры, предотвращающие биодеградацию защитного слоя гетероповерхностного сорбента. В то же время использование элюента с высоким содержанием (> 20%) органического растворителя обеспечивает сохранность защитного слоя на поверхности ГС.

Для элюента натрийфосфатный буферный раствор ($pH = 6,5$) – ацетонитрил (90:10) варьирование концентрации фосфатов в буферном растворе от 0,02 до 0,2 М не влияет на удерживание бензойной кислоты, теофиллина и кофеина, что свидетельствует о незначительном вкладе ионообменных взаимодействий в удерживание молекул сорбатов ГС. Фактор удерживания для бензойной кислоты $k = 1,4 \pm 0,1$; для теофиллина $k = 3,2 \pm 0,1$ и для кофеина $k = 7,3 \pm 0,3$.

Из-за полиамфолитной природы ЧСА варьирование pH элюента изменяет степень протонирования ионоогенных групп и влияет на ионообменные свойства ГС. При изменении pH элюента 0,02 М натрийфосфатный буферный раствор – ацетонитрил (95:5) в диапазоне от 3,0 до 6,0 удерживания теофиллина и кофеина, обладающих основной природой, незначительно увеличивается. Фактор удерживания для теофиллина $k = 4,0 \pm 0,2$, для кофеина $k = 9,1 \pm 0,4$. По мере повышения pH до 7,5 фактор удерживания теофиллина монотонно уменьшается вплоть до $k = 2,7$. Фактор удерживания кофеина при этом остаётся неизменным. Фактор удерживания бензойной кислоты в диапазоне pH от 7,5 до 5,0 постоянен ($k = 1,3$), при снижении pH до 4,5 он существенно увеличивается ($k = 7,5$), при $pH = 4,5$ возрастает ещё больше ($k = 14$), а при $pH < 4$ бензойная кислота полностью поглощается сорбентом из-за взаимодействия с протонированными аминогруппами ЧСА. Следо-

вательно, элюенты с pH от 5,0 до 7,5 применимы для определения всех сорбатов, тогда как элюенты с $pH < 4,0$ непригодны для разделения веществ кислой природы на ГС колонке.

Выводы

Белки плазмы человеческой крови не удерживаются на гетероповерхностном сорбенте и элюируются одним пиком из ГС колонки до выхода низкомолекулярных лекарственных компонентов пробы. Время удерживания гидрофобных сорбатов на ГС несколько меньше, чем на ОФС. Сходство характеристик удерживания на гетероповерхностном сорбенте и на широко используемых гидрофобных сорбентах позволяет прогнозировать последовательность выхода и времена удерживания целевых компонентов и использовать отработанные методики после незначительной адаптации.

Несмотря на то, что лучше производить предварительную фильтрацию плазмы крови перед её вводом в хроматографическую систему, допустимо введение суммарно до 50 мг белков нефилтрованной плазмы при использовании схемы с обратной промывкой ГС колонки метанолом.

ГС позволяет использовать элюенты с различными концентрациями органического модификатора, однако при длительной эксплуатации ГС колонки в элюентах с низким (менее 10%) содержанием ацетонитрила или метанола необходимо принимать меры против биодеградации сорбента.

Допустимый диапазон pH элюента составляет от 4,5 до 7,5. При меньших значениях на защитном покрытии ГС может наблюдаться поглощение кислых сорбатов. Для отделения теofilлина и кофеина от белковых компонентов пробы достаточно использования короткой колонки 20×4 мм с гетероповерхностным сорбентом.

Применение предколонки с ГС позволяет производить определение кофеина и теofilлина в плазме крови после её фильтрации, исключив нежелательные стадии предварительной подготовки пробы.

Список литературы

1. Богословский С.Ю. Применение ультразвука для улучшения характеристик гетероповерхностных сорбентов для ВЭЖХ // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 4 – С. 306.
2. Копылов Р.В., Нестеренко П.Н., Сердан А.А., Тюленина И.П. Синтез и изучение новых гетероповерхностных сорбентов // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 1998. – Т. 39. – № 4. – С. 280–284.
3. Лисичкин Г.В., Фадеев А.Ю., Сердан А.А., Нестеренко П.Н., Мингалев П.Г., Фурман Д.Б. Химия привитых

поверхностных соединений / под ред. Г.В. Лисичкина. – М.: Физматлит, 2003. 592 с.

4. Сердан А.А., Староверов С.М., Богословский С.Ю., Лисичкин Г.В. Способ получения сорбента для разделения биологических жидкостей. А.с. 1788463 СССР // Б.И. – 1993. – № 2.
5. Fagundes V.F., Leite C.P., Pianetti G.A., et al. Rapid and direct analysis of statins in human plasma by column-switching liquid chromatography with restricted-access material // J. Chromatogr. B. – 2014. – Vol. 947–948. – P. 8–16.
6. Li Y., Gu C., Gruenhagen J., Zhang K., Yehl P., Chetwyn N.P., Medley C.D. A size exclusion-reversed phase two dimensional-liquid chromatography methodology for stability and small molecule related species in antibody drug conjugates // J. Chromatogr. A. – 2015. – Vol. 1393. – P. 81–88.
7. Moein M.M., Said R., Bassyouni F., et al. Solid Phase Microextraction and Related Techniques for Drugs in Biological Samples // Journal of Analytical Methods in Chemistry. – Vol. 2014. – 24 p. doi: 10.1155/2014/921350.
8. Serdan A.A., Bogoslovskiy S.Yu., Nesterenko P.N. Retention of certain medicinal preparations on diphilic sorbent as a function of pH and eluent ionic strength // Russ. J. Phys. Chem. – 1991. – Vol. 65 (10), – P. 1396–1399.
9. Yang S.H., Fan H., Classon R.J., Schug K.A. Restricted access media as a streamlined approach toward on-line sample preparation: Recent advancements and applications // Journal of Separation Science. – 2013. – Vol. 36. Issue 17. – P. 2922–2938. doi: 10.1002/jssc.201300595.

References

1. Bogoslovskij S.Yu. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamentalnyh issledovanij*, 2015, no. 4, pp. 306.
2. Kopylov R.V., Nesterenko P.N., Serdan A.A., Tyulenina I.P. *Vestnik Moskovskogo Univ. Ser. 2. Khimia*. 1998. Vol. 39. no. 4. pp. 280–284.
3. Lisichkin G.V., Fadeev A.Y., Serdan A.A., Nesterenko P.N., Mingalyov P.G., Furman D.B. *Khimija privitykh poverynostnykh soedinenii* [Chemistry of Surface Grafted Compounds] / Ed. G.V. Lisichkin. M.: Fizmatlit. 2003. 592 p.
4. Serdan A.A., Staroverov S.M., Bogoslovskij S.Ju., Lisichkin G.V. A.s. 1788463 SSSR // B.I. 1993. no. 2.
5. Fagundes V.F., Leite C.P., Pianetti G.A., Fernandes C. J. *Chromatogr. B*. 2014. Vol. 947–948. pp. 8–16.
6. Li Y., Gu C., Gruenhagen J., Zhang K., Yehl P., Chetwyn N.P., Medley C.D. *J. Chromatogr. A*. 2015. Vol. 1393. pp. 81–88.
7. Moein M.M., Said R., Bassyouni F., Abdel-Rehim M. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Vol. 2014. 24 p. doi: 10.1155/2014/921350.
8. Serdan A.A., Bogoslovskiy S.Yu., Nesterenko P.N. *Russ. J. Phys. Chem.* 1991. Vol. 65 (10). pp. 1396–1399.
9. Yang S.H., Fan H., Classon R.J., Schug K.A. *Journal of Separation Science*. 2013. Vol. 36. Issue 17. pp. 2922–2938. doi: 10.1002/jssc.201300595.

Рецензенты:

Лисичкин Г.В., д.х.н., главный научный сотрудник, профессор, зав. лабораторией химии поверхности кафедры химии нефти и органического катализа химического факультета, МГУ, г. Москва;

Рощина Т.М., д.х.н., профессор, лаборатория адсорбции и хроматографии кафедры физической химии химического факультета, МГУ, г. Москва.