
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ.
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ, МЕТОДОЛОГИЯ, ПРИМЕНЕНИЕ

УДК 543.544.5.068.7: 615.2/.3: 611.018.54

© Г. А. Фёдорова, Е. П. Подольская, А. В. Новиков,
Я. И. Лютвинский, Н. В. Краснов**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИКЛОСПОРИНА А В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА**

Предложена экономичная ВЭЖХ-методика для определения циклоспорина А в сыворотке крови пациентов. Хроматографический анализ выполнен на жидкостном хроматографе Милихром А02. Для идентификации пика циклоспорина А на хроматограмме и подтверждения его гомогенности использовали спектральные отношения и сочетание ЖХ-МС в режиме прямой стыковки. Методика позволяет определять циклоспорин А во всем интервале терапевтических концентраций (100–400 нг/мл) с погрешностью не более 15 %. Результаты определения использованы для терапевтического лекарственного мониторинга циклоспорина А в онкогематологическом отделении Иркутской государственной областной детской клинической больницы.

ВВЕДЕНИЕ

Для терапевтического лекарственного мониторинга циклоспорина А в клинической практике традиционно используют иммунологические методы. Метод ВЭЖХ также используют для определения циклоспорина А, но его активное применение в рутинной клинической практике ограничено по многим причинам, в том числе и из-за отсутствия удобных и экономичных методик анализа. В связи с низкой терапевтической концентрацией циклоспорина А в сыворотке крови (100–400 нг/мл) в качестве детектора при ВЭЖХ-определении обычно используют ESI-МС [1] или ESI-МС-МС [2], что позволяет существенно повысить чувствительность определения и надежность идентификации определяемого компонента, но высокая стоимость этого оборудования делает экономически невыгодным применение МС-детектора в рутинном анализе.

При определении циклоспорина А методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при использовании стандартного аналитического оборудования требуется концентрирование из большого объема сыворотки (1 мл) и введение внутреннего стандарта.

В связи с этим целью нашей работы явилась оптимизация существующих ВЭЖХ-методов определения циклоспорина А и создание методики, пригодной для серийного рутинного анализа.

Циклоспорин А — циклический пептид, состоящий из 11 аминокислот (рис. 1). В качестве подготовки пробы для извлечения циклоспорина А из сыворотки крови обычно используют либо жидко-жидкостную [3, 4], либо твердофазную экстракцию [2, 5] с последующим МС-реже УФ-детектированием [3–7].

Хроматографическое определение на обращен-

ной фазе выполняют в двух- или трехкомпонентных подвижных фазах, состоящих из ацетонитрила, метанола и воды или буфера в режиме изократического элюирования [3–7]. Температура хроматографической колонки в процессе определения варьируется от комнатной [5] до 70–80 °С [2–4, 6] и зависит от емкости используемого сорбента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали циклоспорин А в виде фармацевтической субстанции ("Novartis"), ацетонитрил для ВЭЖХ ("Криохром", Санкт-Петербург, Россия), хлористый метилен, гексан, перхлорат лития и муравьиную кислоту — квалификация не ниже х. ч.

Хроматографический анализ выполняли на жидкостном хроматографе Милихром А02 (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск, Россия). Колонка Ø2 × 75 мм с Nucleosil 100-5 C18 ("Macherey-Nagel", Duren, Germany). Температура колонки 70 °С. Элюент А: 0.2 М LiClO₄—H₃PO₄, pH 3; элюент Б: MeCN. Градиент: линейный, 2500 мкл от 50 % Б до 80 % Б, 1000 мкл 80 % Б. Скорость потока 150 мкл/мин. Детектирование на длинах волн 200, 204, 210 и 214 нм. Объем пробы 50 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили на приборе MX-5310, оборудованном источником ионизации "электроспрей" (electrospray ionization, ESI) с ортогональным вводом ионов и времяпролетным масс-анализатором (TOF) (ESI-TOF), (ИАН РАН, Санкт-Петербург, Россия). Запись спектра вели в режиме детектирования положительных ионов. При проведении масс-спектрометрического эксперимента в качестве подвижных фаз использовали: элюент А — 0.5 % HCOOH

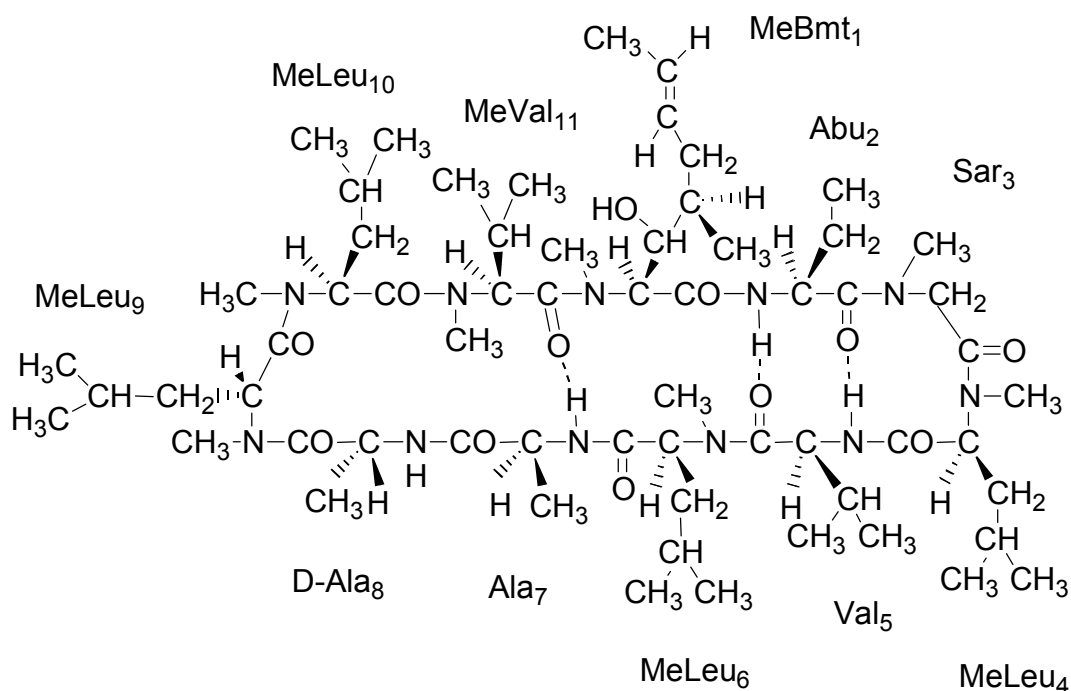


Рис. 1. Структурная формула циклоспорина А

в воде (рН 2.5), элюент Б — 0.5 % HCOOH в ацетонитриле. Градиент линейный, 2500 мкл от 50 % Б до 80 % Б, 1000 мкл 80 % Б.

Для проведения анализа к 600 мкл сыворотки крови добавляли 600 мкл ацетонитрила для осаждения белков сыворотки и центрифугировали. 1000 мкл супернатанта переносили в другую пробирку и добавляли 1000 мкл хлористого метилена. После экстракции (5 мин) и расслоения фаз водный слой отбрасывали, а органический переносили в чистую пробирку и упаривали досуха в токе аргона. Сухой остаток, содержащий циклоспорин А, перерастворяли в 70 мкл 50 %-го водного ацетонитрила, содержащего 1 % муравьиной кислоты, добавляли 0.5 мл гексана и встряхивали 5 мин. После разделения слоев нижний слой переносили в пробирку для автосамплера и хроматографировали.

Идентификацию пика циклоспорина А на хроматограмме экстракта сыворотки крови выполняли по времени удерживания, спектральным отношениям и данным МС. Концентрацию циклоспорина А в исходной сыворотке рассчитывали по градуировочной зависимости, полученной на основе градуировочных растворов. Градуировочные растворы готовили путем добавления стандартного раствора циклоспорина А к донорской сыворотке. Далее пробы обрабатывали в соответствии

с прописью методики. Градуировочная зависимость для циклоспорина А получена для 5 концентраций в интервале 50–400 нг/мл (в пересчете на исходную сыворотку, $n = 5$) Погрешность определения не превышала 15 % в интервале терапевтических концентраций (100–400 нг/мл).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе предложена микроколочная ВЭЖХ-методика для определения циклоспорина А в сыворотке крови пациентов. Обработка образца гексаном перед его введением в хроматограф позволяет устранить мешающее влияние УФ-поглощающих гидрофобных компонентов матрицы, применение микроколочного варианта ВЭЖХ определяет экономичность методики, а многоволновое спектрофотометрическое детектирование повышает надежность идентификации циклоспорина А.

Обычно высокогидрофобные соединения, содержащиеся в необработанной сыворотке крови, сорбируются на обращенной фазе С 18, значительно сокращая время эксплуатации хроматографической колонки. Полное удаление таких веществ из колонки возможно только при введении в состав подвижной фазы таких растворителей, как

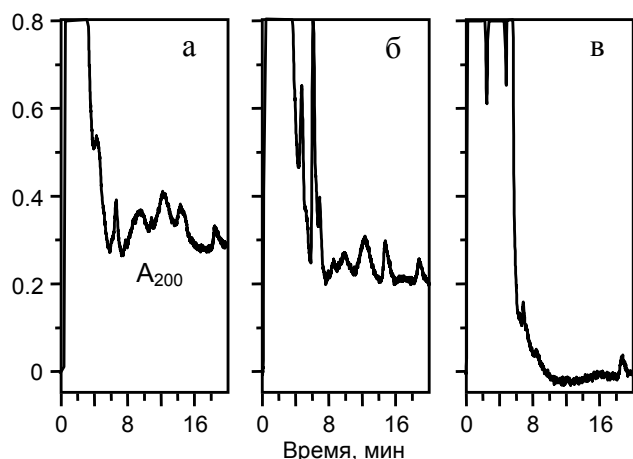


Рис. 2. Хроматограммы сыворотки крови при различных способах обработки пробы. а — без обработки гексаном; б — после экстракции гексаном, pH 7; в — после экстракции гексаном, pH 2.5

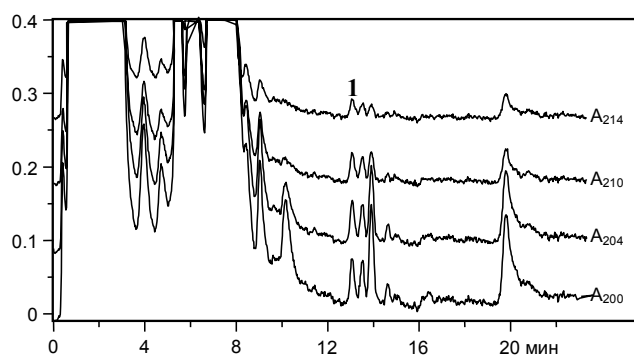


Рис. 3. Хроматограмма экстракта сыворотки крови пациента, принимающего лечение циклоспорином А (200 мг/сутки). Концентрация циклоспорино А в исходной сыворотке составляет 98 ± 10 нг/мл. 1 — циклоспорин А

ацетон, гексан, хлороформ, что, как правило, неудобно, особенно при масс-спектрометрическом детектировании. Предварительная обработка пробы гексаном позволяет удалить часть таких соединений. Нами показано, что гексан извлекает из 1 мл сыворотки крови в нейтральной среде (сыворотка : гексан = 1 : 5; $pH_{сыв.} \approx 7$) от 0.8 до 1.2 мг липидов, 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 гидрофобные соединения.

Значения спектральных отношений циклоспорино А

Спектральные отношения, R	Циклоспорин А (проба)	Циклоспорин А (стандарт)
S_{204}/S_{200}	0.918	0.938
S_{210}/S_{200}	0.626	0.658
S_{214}/S_{200}	0.520	0.566

Более полное извлечение возможно при экстракции гексаном из кислой среды (pH 2.5) после осаждения белков ацетонитрилом (рис. 2). Этот прием был нами использован при определении циклоспорино А в сыворотке крови. Регистрируемый при этом пик циклоспорино А (рис. 3) симметричен, несмотря на большой объем инъецируемой пробы (растворитель — 50 %-й ацетонитрил), и полностью отделен от сопутствующих компонентов.

При УФ-ВЭЖХ-определении циклоспорино А для повышения надежности идентификации обычно используют метод внутреннего стандарта [3, 4, 7]. К недостаткам этого приема при определении циклоспорино А можно отнести коммерческую недоступность предлагаемых стандартных соединений. Многоволновая фотометрическая детекция позволяет ввести дополнительные параметры для идентификации определяемого соединения и, таким образом, отказаться от необходимости использования внутреннего стандарта. В таблице приведены спектральные отношения, рассчитанные как отношение площадей пиков, зарегистрированных при длинах волн λ_x и λ_{200} . Совпадение в пределах ошибки (± 0.05) спектральных отношений и времени удерживания пика циклоспорино А в экстракте сыворотки крови со спектральными отношениями и временем удерживания пика стандартного раствора свидетельствуют об идентичности и гомогенности пика определяемого соединения. Для подтверждения надежности определения на стадии разработки методики идентификацию пика циклоспорино А в экстрактах сыворотки крови проводили с использованием масс-спектрометрического детектирования методом ESI-TOF в режиме "on-line" (рис. 4).

Применение короткой колонки по сравнению с традиционной аналитической колонкой $\varnothing 4.6 \times 250$ мм позволяет в 10–20 раз снизить расход растворителей и во столько же раз повысить чувствительность определения. Кроме этого, режим градиентного элюирования позволяет еще вдвое снизить предел определения циклоспорино А.

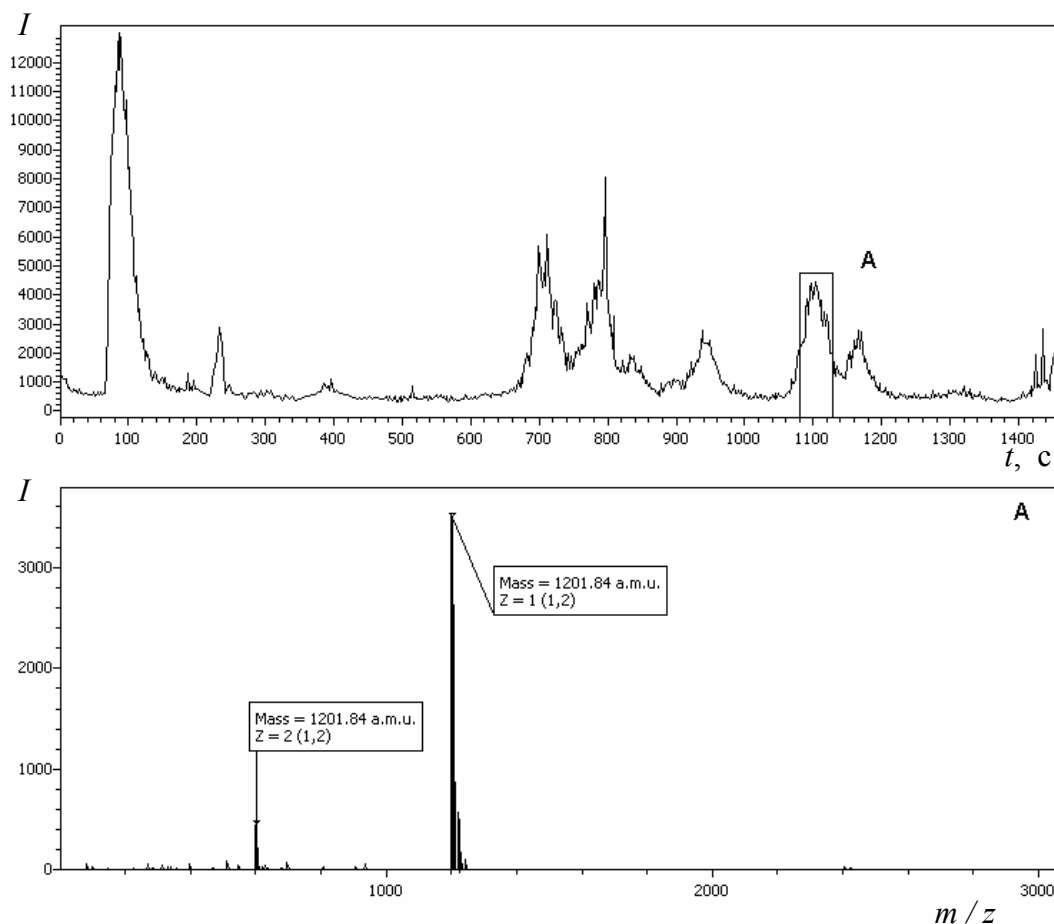


Рис. 4. Идентификация пика циклоспорина А в экстрактах сыворотки крови методом хромато-масс-спектрометрии.

А — масс-спектр, соответствующий хроматографическому пику А

Разработанная методика апробирована в клинической практике онкогематологического отделения Иркутской государственной областной детской больницы. В соответствии с Международным протоколом IPH-93-APL 2 (версия 1996) "Комбинированная иммуносупрессивная терапия приобретенных апластических анемий" при лечении требуется мониторинг концентрации циклоспорина А, концентрация которого в крови ребенка должна находиться в интервале 150–300 нг/мл.

Для определения минимальной концентрации циклоспорина А кровь из локтевой вены отбирали за 1–2 ч до утреннего приема препарата. Методика оказалась эффективна при коррекции доз циклоспорина А в процессе лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou L., Tan D., Theng J., Lim L., Liu Y.-P., Lam K.-W. // J. Chromatogr. B. 2001. V. 754. P. 201–207.
2. Taylor P.J., Jones C.E., Martin P.T., Lynch S.V., Johnson A.G., Pond S.M. // J. Chromatogr. B. 1998. V. 705. P. 289–294.
3. Bardelmeijer H.A., Ouwehand M., Beijnen J.H., Schellens J.H.M., Tellingen O. // J. Chromatogr. B. 2001. V. 763. P. 201–206.
4. Brozmanova H., Grundmann M., Safarcik K., Jegorov A. // J. Chromatogr. B. 2000. V. 749. P. 93–100.
5. Golabi N., Tajerzadeh H., Ghassempour A. // Talanta. 2003. V. 59. P. 1089–1094.

6. Chimalakonda A.P., Shah R.B., Mehvar R. // *J. Chromatogr. B.* 2002. V. 772. P. 107–114. *Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Подольская Е.П., Новиков А.В., Лютвинский Я.И., Краснов Н.В.)*
7. Khoschorur G., Semmelrock H.J., Rodl S., Auer T., Petek W., Iberer F., Tscheliessnigg K.H. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 690. P. 367–372.

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск (Фёдорова Г.А.)

Материал поступил в редакцию 2.10.2008.

CYCLOSPORINE A DETERMINATION IN HUMAN BLOOD SERUM FOR THERAPEUTIC MONITORING

G. A. Fedorova¹, E. P. Podolskaya², A. V. Novikov², Ya. I. Lutvinsky², N. V. Krasnov²

¹*Limnological Institute SD RAS, Irkutsk*

²*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

New economical HPLC-method for cyclosporine A determination in patient blood serum has been proposed. Chromatography analysis was carried out on liquid chromatograph "Milichrom A02". For cyclosporine A peak identification and its homogeneity confirmation spectral ratios and on line LC-MS complex were used. The method allows determination of cyclosporine A in 100–400 ng/ml range with no more than 15 % error. Results of determination are used for therapeutic monitoring of cyclosporine A in oncology department of pediatric clinic.