

УДК 543+ 544.173+ 504.064

© Л. В. Некрасова, Я. В. Русских, А. В. Новиков,
Н. В. Краснов, З. А. Жаковская

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА (ВЭЖХ—ТАНДЕМНОЙ МС ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ) ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРИРОДНОЙ ВОДЕ

В статье представлена методика по определению лекарственных соединений (кофеин, кетопрофен, диклофенак, ципрофлоксацин) в природной воде с применением метода ВЭЖХ—танDEMной масс-спектрометрии высокого разрешения (прибор LTQ Orbitrap, "ThermoFinnigan", США) и твердофазной экстракции (картриджи Oasis HLB). Для растворов стандартов данных соединений установлен порог устойчивого обнаружения, пределы обнаружения (5–10 нг/л) и коэффициенты извлечения. Также представлены результаты измерения стандартов исследуемых веществ с использованием двух моделей времяпролетных масс-спектрометров — MX 5310 (ИАП РАН) и LCMS-IT-TOF (фирмы "Shimadzu").

Кл. сл.: лекарственные соединения, жидкостная хроматография, масс-спектрометрия высокого разрешения, тандемная масс-спектрометрия, твердофазная экстракция

ВВЕДЕНИЕ

Фармацевтическое производство ежегодно поставляет на мировой рынок тысячи тонн лекарственных препаратов. Большинство лекарственных веществ хорошо растворяются в воде, что значительно затрудняет очистку сточных вод от данных соединений. Кроме того, они, как правило, не разлагаются активным илом и проходят через очистные сооружения транзитом, поступая затем в водоемы, водооток и грунтовые воды. Известно, что данные соединения попадают в окружающую среду со стоками сельскохозяйственных, промышленных и муниципальных вод, а также с бытовыми отходами и отходами медицинских учреждений [1].

Присутствие лекарственных соединений в окружающей среде может приводить к нарушению физиологических процессов и репродуктивной функции живых организмов, повышению уровня онкологических заболеваний, появлению антибиотико-устойчивых штаммов бактерий, возникновению потенциально опасных химических смесей, содержащих метаболиты лекарственных веществ (как катализаторов нежелательных процессов) [2].

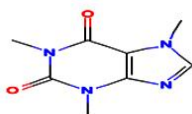
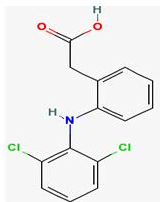
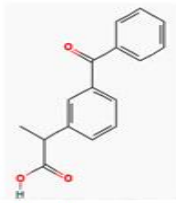

Поскольку лекарственные соединения присутствуют в природной или питьевой воде в достаточно низких концентрациях (как правило, до 10 нг/л), то для идентификации и количественного определения данных соединений требуются высо-

кочувствительные и высокоселективные аналитические методы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия, в том числе тандемная масс-спектрометрия [3–10].

Работы по разработке высокочувствительных аналитических методик определения фармацевтических веществ в окружающей среде проводятся возрастающими темпами с конца 90-х годов в США, Канаде, Бразилии, Израиле и во многих европейских странах [3–12]. Однако в РФ такого рода исследовательские и эко-аналитические работы до сих пор практически не проводились. В то же время многие регионы РФ, в том числе Санкт-Петербург и Ленинградская область, оказывают на окружающую среду значительную техногенную и урбанистическую нагрузку, связанную с производством и широким использованием медицинской продукции.

В 2008 г. в НИЦЭБ РАН были начаты научно-исследовательские работы, целью которых является разработка химико-аналитических методов определения лекарственных соединений в водных объектах окружающей среды. Одним из важных начальных этапов работы являлся выбор приоритетных лекарственных соединений для дальнейшего исследования. При решении данной задачи опирались на литературные данные и исследования, проведенные к настоящему времени за рубежом, а также на медико-статистические и коммерческие данные состояния фармацевтического рынка

Табл. 1. Лекарственные соединения в окружающей среде

Название	Молекулярная формула	Точная масса иона МН ⁺ , Да	Структура	Название препарата
Кофеин	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	195.08820		Ринза, Пенталгин, Седальгин-Нео, Нурофен, Седал М, Солпадеин; напитки и продукты питания
Диклофенак	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296.02454		Вольтарен мультгель, Диклак гель, Диклофенак ретард
Кетопрофен	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	255.10211		Фастум гель, Кетонал крем, Быструм гель
Ципрофлоксацин	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	332.14105		Цифран, Ципромед (глазные капли), Ципролет

России, и в частности Северо-западного региона, за период с 2007 по декабрь 2009 г. На основе этих исследований был составлен список лекарственных соединений, входящих в состав фармацевтических препаратов, наиболее распространенных на территории РФ и во многих других странах. Эти соединения представлены в табл. 1. Одно из этих веществ, кофеин, наиболее распространено и встречается не только в лекарственных препаратах, но и в продуктах питания и напитках. Кофеин, обнаруженный в объектах окружающей среды, считается антропогенным маркером [13]. Масштабные исследования химической загрязненности рек, проведенные в конце 20-го века в Америке и Швейцарии, показали присутствие кофеина в концентрациях от десятков до тысяч нг/л [14].

Отработка методики осуществлялась на стандартных образцах и модельных системах, которые представляют собой растворы смеси стандартных веществ с известной концентрацией в дистиллированной воде. С целью исследования влияния матричных эффектов использовали растворы смеси стандартных веществ в природной воде, не содержащей исследуемых соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали стандарты лекарственных веществ — кофеин (Sigma-Aldrich) и образцы российской фармацевтической компании "Активный компонент" Кетопрофен, Диклофенак и Ципрофлоксацин (чистота не менее 99.8 %); ацетонитрил ("Криохром", сорт "0", Санкт-Петербург, Россия); метанол марки LC-MS CHROMASOLV; воду, очищенную в системе Milli-Q (электропроводность 0.056 мкСм/см при 25 °С); трифторуксусную кислоту, очищенную перегонкой; тетра-натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma-Aldrich).

Измерения в основном проводили с использованием жидкостного хроматографа—тандемного масс-спектрометра высокого разрешения LTQ Orbitrap фирмы "Thermo" (США). Объем вводимой пробы 25 мкл. Колонка C18 Thermo Hypersil Gold, 50 × 2.1 мм, 1.9 мкм.

Режим хроматографирования

Элюент А: 0.05 %-я водная трифторуксусная

кислота. Элюент В: 0.05 %-й раствор ТФУ в ацетонитриле.

Градиент:
 0–2 мин 10 % В;
 2–23 мин 10–90 % В;
 23.0–23.1 мин 90–10 % В.

Интервал 10 мин до следующего ввода. Поток элюента 0.2 мл/мин.

Масс-спектрометрия

Характеристики масс-анализа: электрораспылительная ионизация (электроспрей), стандартные условия; положительные ионы. Масс-анализатор в режиме 1 — орбитальная ловушка, разрешение 30 000. Диапазон масс 100–750. Режим MS²: HCD и CID (ионная ловушка), энергия столкновений 5–55 %.

Также была изучена возможность решения рассматриваемых аналитических задач с использованием времяпролетных масс-спектрометров на примере отечественного прибора МХ 5310 и его зарубежного аналога LCMS-IT-TOF (фирмы "Shimadzu"), на которых были проведены измерения для растворов стандартов исследуемых веществ.

Хромато-масс-спектрометр МХ 5310 разработан в Лаборатории биомедицинской масс-спектрометрии Института аналитического приборостроения РАН. Растворы вводили в масс-спектрометр в режиме электрораспыления через жидкостный хроматограф Милихром А-02 ("Эконова", Новосибирск). Введенная проба — 1 нмоль каждого соединения. Хроматографическая колонка 2 × 75 мм, сорбент — Prontosil AQC18. Градиентный режим: от 5 до 95 % (по объему) водного ацетонитрила (содержит 0.05 % ТФУ).

Прибор LCMS-IT-TOF разработан для проведения высокоэффективной хроматографии—масс-спектрометрии высокого разрешения ($R \geq 10\,000$). Это комбинация жидкостного хроматографа и масс-спектрометра с системой ввода образца электроспрей (ESI), ионной ловушкой и времяпролетным детектором. Рабочий режим находится в интервале масс m/z от 50 до 5000 (3000 при MS-MS), точность 5 ppm — с внутренним стандартом и 10 ppm — с внешним.

Хроматографирование проводили в том же режиме, что и при использовании прибора LTQ Orbitrap с той же колонкой (C18 Thermo Hypersil Gold, 50 × 2.1 мм, 1.9 мкм). Объем вводимой пробы составлял 10 и 25 мкл.

Масс-спектрометрия: электроспрей, положительные ионы, диапазон масс 100–750, интервал выделения заданной массы в SIM-режиме — 0.5 Da, напряжение на детекторе 1.7 кВ.

Для выделения исследуемых соединений из водных объектов был выбран метод твердофазной экстракции [5–7, 9, 10] с использованием картриджей Oasis HLB 3cc (60 мг) фирмы "Waters". Подбор и видоизменение условий экстракции проводили, принимая во внимание прототип разработанной методики EPA [15].

Обработка методики экстракции осуществлялась на модельных растворах с концентрацией каждого исследуемого соединения 30 нг/л. Для приготовления модельных растворов использовали дистиллированную воду.

Воду с добавкой стандартных соединений подкисляли концентрированной соляной кислотой, доводя pH до 3, и добавляли 0.5 г тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты. Перемешивали и выдерживали 1–2 ч.

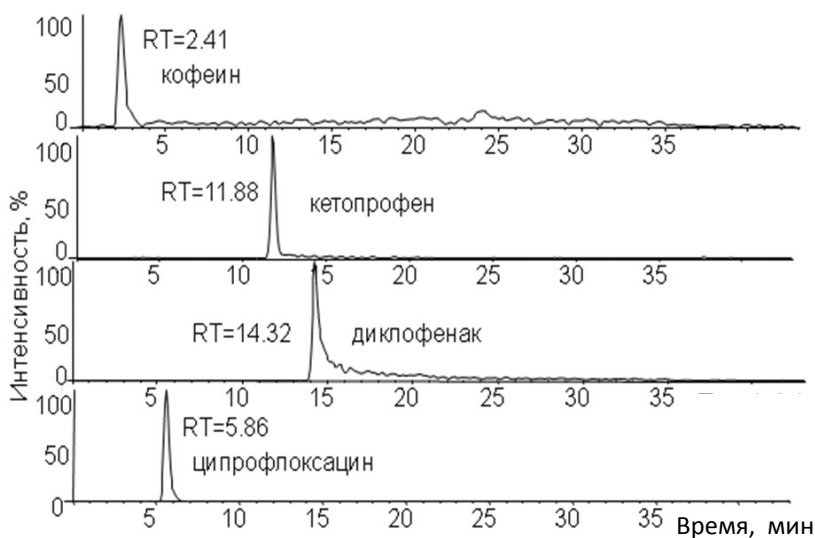


Рис. 1. Масс-хроматограммы, зарегистрированные для иона МН⁺ в условиях MS1. Ввод 5 нг каждого из аналитических стандартов в растворе

Перед экстракцией картриджи кондиционировали 20 мл метанола, 6 мл очищенной воды и 6 мл этой же воды, подкисленной до pH 3. Затем аликвоту пробы последовательно пропускали через 2 картриджа, поток 5–10 мл/мин. Картриджи промывали 10 мл воды и сушили в вакууме в течение 5 мин. Экстракт элюировали с каждого картриджа 25 мл метанола. Затем метанол удаляли на роторном испарителе. Сухой остаток растворяли в 1 мл смеси воды и ацетонитрила (объемное соотношение 90:10), содержащей 0.05 % трифторуксусной кислоты.

Количественное определение проводили методом внешнего стандарта. В качестве растворов сравнения были приготовлены растворы смеси четырех указанных лекарственных соединений с концентрацией 30 нг/мл каждого компонента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованиях использовался комплексный метод жидкостной хроматографии—тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения с использованием хромото-масс-спектрометра LTQ

Orbitrap с линейной и орбитальной ловушками и режимом положительной электроспрей-ионизации (ESI+). В хроматографической части прибора на колонке происходит разделение анализируемой пробы. Масс-спектрометрия высокого разрешения позволяет получить точные значения масс анализируемых веществ. Тандемная масс-спектрометрия предоставляет информацию о структуре компонента. Кроме того, масс-спектрометрия является высокочувствительным и высокоспецифичным методом анализа, что позволяет обнаруживать меньше 1 нг вещества во вводимой пробе и облегчает его идентификацию.

Идентификацию проводили по точным массам ионов MH^+ (совпадение в пределах 5 ppm) и хроматографическим временам удерживания (совпадение в пределах 0.3 мин) (рис. 1), информацию о структуре соединений получали из тандемных масс-спектров (рис. 2, 3). Эти данные являются основой для идентификации соединений в реальных пробах. Также был установлен порог устойчивого обнаружения аналитов из растворов смеси стандартов исследуемых соединений, который составил 0.2 нг на ввод (в SIM-режиме).

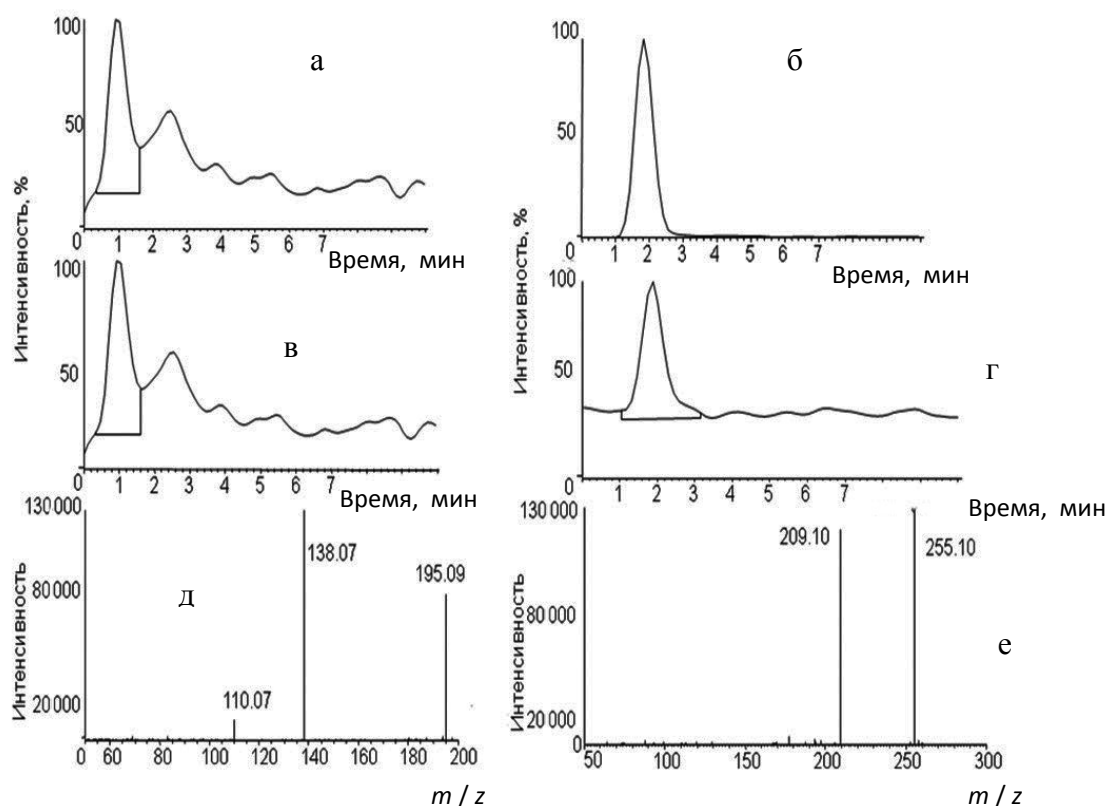


Рис. 2. Масс-хроматограммы, зарегистрированные для иона MH^+ в условиях MS1 и MS2 для кофеина (а, в) и кетопрофена (б, г); масс-спектры MS2 в режиме HCD: для кофеина (д) (энергия столкновений 55 %) и кетопрофена (е) (энергия столкновений 20 %). Режим хроматографирования изменен по сравнению со стандартным

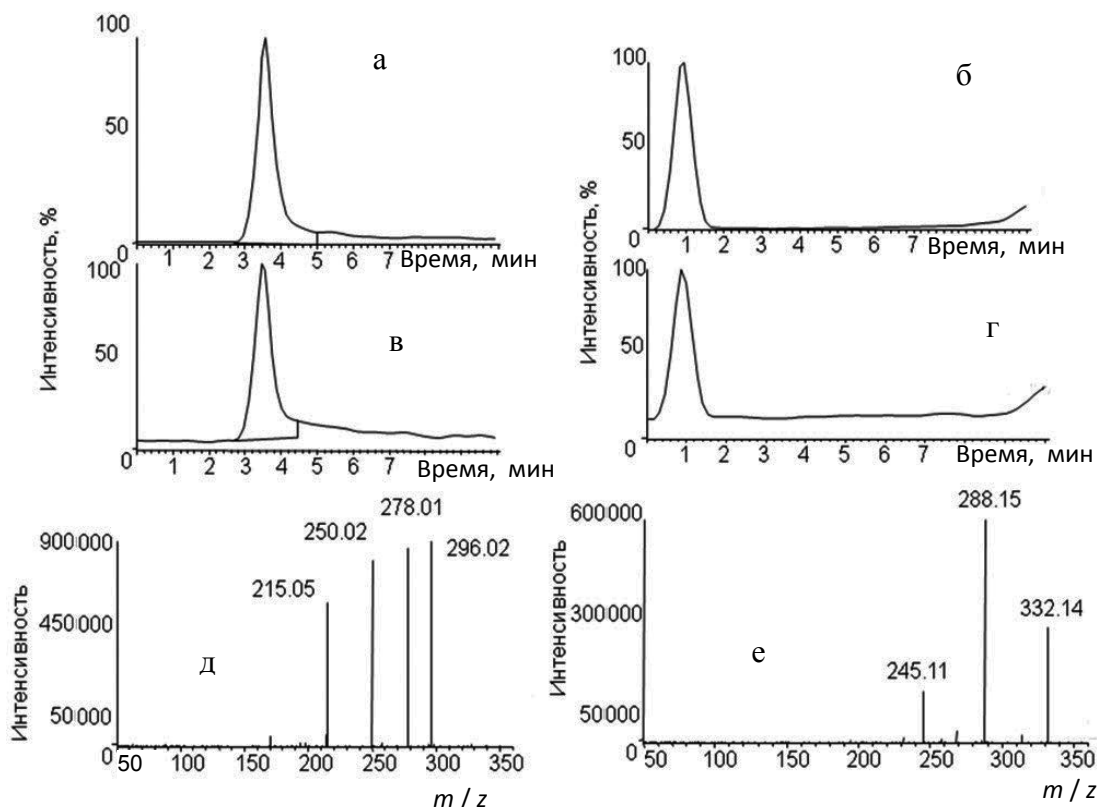


Рис. 3. Масс-хроматограммы, зарегистрированные для иона MH^+ в условиях MS1 и MS2 для диклофенака (а, в) и ципрофлоксацина (б, г); масс-спектры MS2 в режиме HCD: для диклофенака (д) (энергия столкновений 15 %) и ципрофлоксацина (е) (энергия столкновений 30 %). Режим хроматографирования изменен по сравнению со стандартным

Табл. 2. Коэффициенты извлечения исследуемых соединений из природной воды

Название соединения	Минимальный предел обнаружения, нг/л	Recovery, %
Кофеин	5	95
Диклофенак	10	98
Кетопрофен	5	42
Ципрофлоксацин	10	80

Исследование природных водных проб с добавкой стандартных веществ, проведенное по данной методике, позволило выявить влияние матричных эффектов и установить для каждого соединения значения коэффициентов извлечения (recovery, %). Для этого определяли отношение площадей пиков на масс-хроматограммах из экстрактов специально подготовленных водных растворов к площадям пиков образцов сравнения — раствора смеси четырех стандартов в водно-ацетонитрильной смеси. Для каждого исследуемого соединения был установлен предел обнаружения, который составил 5–10 нг/л. (табл. 2).

В ходе работы было проведено сравнение масс-

спектрометрических данных, полученных для смеси аналитических стандартов с использованием жидкостных хромато-масс-спектрометров с различными типами детектирования и ионных ловушек — на примере LTQ Orbitrap и времяпролетных масс-спектрометров MX 5310 (ИАП) и LCMS-IT-TOF (фирмы "Shimadzu").

В табл. 3 приведены сравнительные данные точности измерения массы в анализах, проведенных с использованием указанных приборов. Видно, что точность определения молекулярной массы в случае применения времяпролетного масс-спектрометра MX 5310 выше, чем у LCMS-IT-TOF, хотя ниже, чем в случае масс-спектрометра LTQ Orbitrap.

Табл. 3. Сравнительная точность определения масс ионов MH^+ , ppm

Соединение	MX 5310	LTQ Orbitrap	LCMS-IT-TOF
Кофеин	-2.3	-0.7	5.6
Кетопрофен	-2.8	-0.8	9.8
Диклофенак	3.3	-0.7	-14.7
Ципрофлоксацин	-1.0	-0.5	1.2

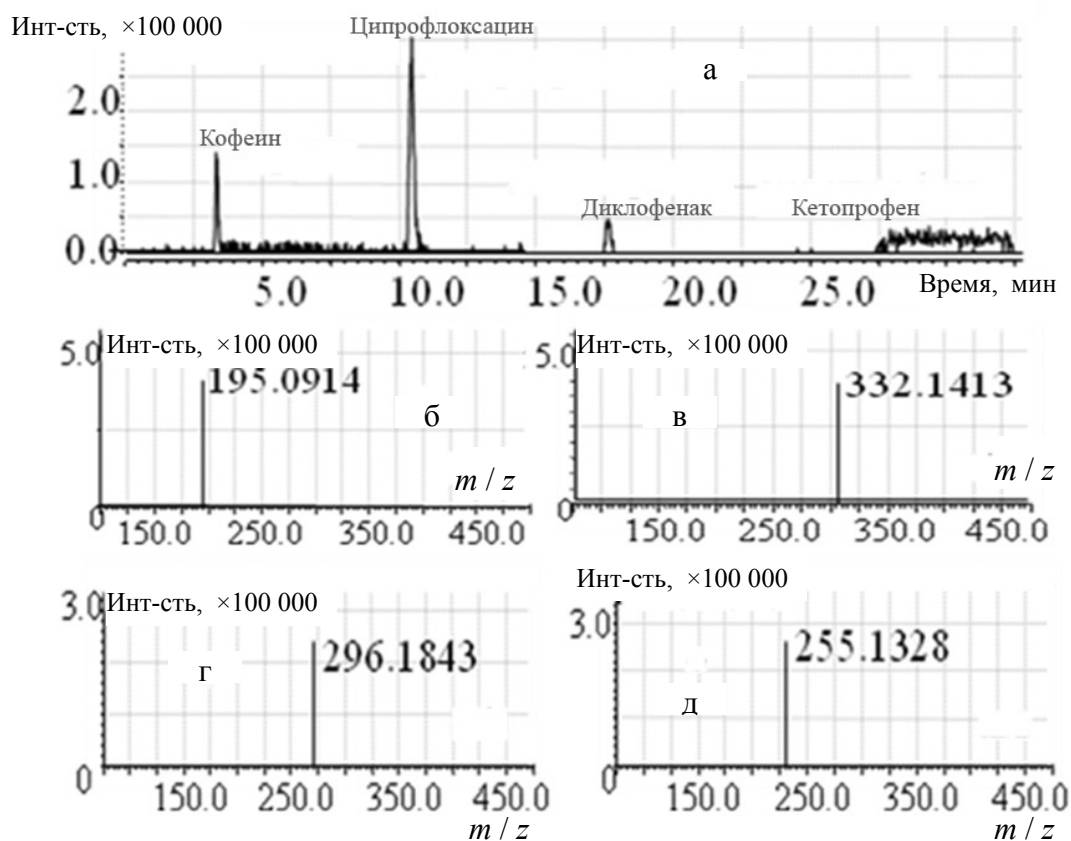


Рис. 4. Масс-хроматограмма (а) и масс-спектры для смеси стандартов лекарственных веществ, зарегистрированные в SIM-режиме на приборе LCMS-IT-TOF

Исходя из изложенного выше можно сказать, что все три прибора применимы для решения задач идентификации указанных соединений. Тем не менее точность определения масс на времяпролетных детекторах не так высока, как при использовании масс-спектрометра LTQ Orbitrap. Это означает, что в случае матриц сложного состава и (или) низких концентраций аналитов селективность определения этих и других соединений может быть относительно невысокой. Кроме того, для MX 5310 отсутствует возможность анализа с использованием тандемной масс-спектрометрии, что также затрудняет точную идентификацию.

ВЫВОДЫ

Разработанная аналитическая методика по определению кофеина, кетопрофена, диклофенака и ципрофлоксацина в природной воде с использованием жидкостного хроматографа—тандемного масс-спектрометра высокого разрешения LTQ Orbitrap фирмы "ThermoFinnigan" (США) характеризуется высокой чувствительностью (очень низким пределом обнаружения вплоть до 5 нг/л) и селективностью (несколько стадий разделения аналитов и мешающих соединений). При этом регистрация характеристичных масс-спектров и точное

измерение масс ионов обеспечивают надежность идентификации определяемых соединений. Исследование влияния матричных эффектов позволило установить коэффициенты извлечения для каждого соединения. Эксперименты, проведенные со смесями стандартных соединений с использованием отечественного прибора МХ 5310 (ИАП РАН), показали, что данный прибор вполне применим для решения задач идентификации указанных соединений. Данные, полученные с помощью LCMS-IT-TOF, несмотря на неплохую чувствительность, отличались не очень хорошей точностью определения масс (рис. 4). Возможно, здесь необходима замена колонки для лучшего разделения компонентов смеси и калибровка прибора в режиме, отличном от стандартного.

Исследование выполнено в рамках комплексного междисциплинарного проекта "Исследование новых загрязнителей окружающей среды в водоемах Санкт-Петербурга и Северо-Западного региона" программы научных исследований СПбНЦ РАН. Кроме того, работа поддержана российско-норвежской программой по образовательному обмену "Emerging persistent organic pollutants in the high North and North-Western Russia" (NORTHPOP).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grote M., Haciosmanoglu B., Nolte J. Extraction of drug traces with liquid membrane systems // Proceedings of the International Solvent Extraction Conference ISEC'2002, Cape Town, 17–21 March, 2002. Marshalltown: S. Afr. Int. Mining and Met., 2002. V. 1. P. 607–613.
2. Kolpin D., Furlong E.T., Meyer M.T., et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance // Environ. Sci. Technol. 2002. V. 36, N 6. P. 1202–1211.
3. Li B., Zhang T., Xu Z., Fang H.H.P. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Analytica Chimica Acta. 2009. V. 645. P. 64–72.
4. Gracia-Lor E., Sancho J.V., Hernandez F. Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. P. 622–632.
5. Shao B., Chen D., Zhang J., et al. Determination of 76 pharmaceutical drugs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in slaughterhouse wastewater // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. P. 8312–8318.
6. Yang S., Carlson K.H. Solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and wastewater matrices // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1038. P. 141–155.
7. Batt A.L., Kostich M.S., Lazorchak J.M. Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS // Anal. Chem. 2008. V. 80. P. 5021–5030.
8. Spongberg A.L., Witter J.D. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio // Science of the total environment. 2008. V. 397. P. 148–157.
9. Lindberg R., Jarnheimer P.-A., Olsen B., et al. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards // Chemosphere. 2004. V. 57. P. 1479–1488.
10. Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. 2008. V. 391. P. 1293–1308.
11. Kummerer K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic acids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review // Chemosphere. 2001. V. 45. P. 957–969.
12. Andreatti R., Raffaele M., Nicklas P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment // Chemosphere. 2003. V. 50. P. 1319–1330.
13. Buerge I.J., Poiger T., Muller M.D., Buser H.R. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters // Environmental Science and Technology. 2003. V. 37. P. 691–700.
14. Chalew T. Chemical indicators of surface water pollution. A thesis submitted to the faculty of the University of North Carolina at Chapel Hill in partial fulfillment of the requirements for the degree of Masters of Science in the Department of Environmental Sciences and Engineering. 2006. 165 p.
15. Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS. Washington, December 2007.

Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН (Некрасова Л.В., Русских Я.В., Жаковская З.А.)

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Новиков А.В., Краснов Н.В.)

Контакты: Некрасова Любовь Валерьевна, viktorovsky@inbox.ru

Материал поступил в редакцию 21.09.2010.

**APPLICATION OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY—HIGH RESOLUTION TANDEM
MASS-SPECTROMETRY FOR DETERMINATION
OF PHARMACEUTICALS IN NATURAL WATER SAMPLES**

**L. V. Nekrasova¹, Ya. V. Russkikh¹, A. V. Novikov²,
N. V. Krasnov², Z. A. Zhakovskaya¹**

¹*Saint-Petersburg Research Center of Ecological Safety RAS*

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

The practical method for detecting of pharmaceuticals (caffeine, ketoprofen, diclofenac, ciprofloxacin) in natural water samples is presented. The solid-phase extraction (Oasis HLB cartridges) and method of high-performance liquid chromatography with high resolution tandem mass-spectrometry (LTQ OrbiTrap, Thermo-Finnigan) were used. The method has been tested on standard solutions. The detection limit (5–10 ng/l), stable detection threshold and recovery for standard solutions have been estimated. The results of the analysis of the standard solutions on two types of TOF mass-spectrometers (MX 5310, IAI RAS and LCMS-IT-TOF, Shimadzu) are also presented.

Keywords: pharmaceuticals, liquid chromatography, high resolution mass-spectrometry, tandem mass-spectrometry, solid-phase extraction