

Влияние условий пробоподготовки и режима хроматографирования на уровень фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе плазмы крови

В. М. Косман*, М. В. Карлина, О. Н. Пожарицкая

Закрытое акционерное общество «Санкт-Петербургский институт фармации»,
Заводская ул., 3, к. 245, г.п. Кузьмолловский, Всеволожский р-н,
Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

Резюме. Метод ВЭЖХ с УФ-детектированием широко используют для количественного анализа лекарственных веществ в биообразцах, полученных при изучении фармакокинетики, биоэквивалентности или лекарственного мониторинга. Основное ограничение связано со значимым фоновым влиянием матриц биообразцов, ограничивающим чувствительность ВЭЖХ-УФ-методик. **Цель работы:** оценка влияния условий пробоподготовки и режима хроматографирования на уровень фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе плазмы крови человека и лабораторных животных. **Материалы и методы:** на примере трех типов плазмы крови (крысы, кролика и человека) рассмотрено влияние осадителя, режима центрифугирования, включения стадии твердофазной экстракции (ТФЭ) в процедуру подготовки проб на уровень фонового сигнала при анализе методом ВЭЖХ-УФ в трех хроматографических режимах при трех длинах волн. **Результаты:** установлено, что уровень фонового сигнала практически не зависит от хроматографического режима, интенсивности центрифугирования и введения стадии ТФЭ; для плазмы крови человека и кролика уровень фонового сигнала имеет тенденцию к снижению по сравнению с сигналом плазмы крови крыс. Наибольшее значение на уровень фонового сигнала оказывает выбор осадителя при пробоподготовке и длина волны детектирования. Показано, что ацетонитрил предпочтительнее, чем метанол, а при выборе длины волны следует по возможности избегать ближневолновой области. **Выводы:** выявленные особенности ключевых моментов процедуры подготовки проб и выбора условий хроматографического анализа могут быть использованы при разработке и валидации биоаналитических методик, применяемых в доклинических и клинических исследованиях.

Ключевые слова: ВЭЖХ-УФ; плазма крови; пробоподготовка; осадитель; хроматографический режим; биоаналитические исследования

Для цитирования: Косман ВМ, Карлина МВ, Пожарицкая ОН. Влияние условий пробоподготовки и режима хроматографирования на уровень фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе плазмы крови. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(2):121–128. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-121-128>

***Контактное лицо:** Косман Вера Михайловна; kosman.vm@doclinika.ru

Effect of Sample Preparation and Chromatographic Conditions on Background Signal Level in HPLC-UV Analysis of Blood Plasma

V. M. Kosman*, M. V. Karlina, O. N. Pozharitskaya

St. Petersburg Institute of Pharmacy,
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky settlement, Vsevolozhsky district,
Leningrad region 188663, Russian Federation

Abstract. The HPLC-UV method is widely used for quantitative analysis of drug substances found in biological samples obtained in pharmacokinetics studies, bioequivalence studies, or during therapeutic drug monitoring. The main limitation is associated with a significant background effect of biological matrixes, limiting the sensitivity of HPLC-UV methods. **The aim** of the study was to evaluate sample preparation and chromatographic conditions in terms of background signal level during HPLC-UV analysis of human and laboratory animal blood plasma. **Material and methods:** three types of blood plasma (rat, rabbit and human), three chromatographic modes, and three detection wavelengths were used to assess the effect of the precipitation agent, centrifuge conditions, and the inclusion of the solid-phase extraction (SPE) step into the sample preparation procedure on the background signal level during HPLC-UV analysis. **Results:** it was established that the background signal was practically unaffected by the chromatographic mode, centrifugation intensity, or introduction of the SPE step. The background signal levels for human and rabbit blood plasma tended to be lower than that for rat blood plasma. The factors that had the greatest effect on the background signal level were the choice of the precipitation agent during sample preparation, and the detection wavelength. It was shown that acetonitrile is preferable to methanol, and that the near UV region should be avoided. **Conclusions:** the identified key aspects of sample preparation procedures and chromatographic conditions can be used in the development and validation of bioanalytical methods for preclinical and clinical studies.

Key words: HPLC-UV; blood plasma; sample preparation; precipitation agent; chromatographic mode; bioanalytical methods

For citation: Kosman VM, Karlina MV, Pozharitskaya ON. Effect of sample preparation and chromatographic conditions on background signal level in HPLC-UV analysis of blood plasma. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(2):121–128. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-121-128>

***Corresponding author:** Vera M. Kosman; kosman.vm@doclinika.ru

Биообразцы (плазма крови, органы и ткани) — довольно частый объект биоаналитических исследований с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [1]. Наиболее распространенной является задача количественного определения различных лекарственных веществ в биообразцах, полученных при изучении фармакокинетики, биоэквивалентности или лекарственного мониторинга. Для биообразцов перед введением в ВЭЖХ-системы требуется специальная пробоподготовка, как для сложных комплексных матриц [2–4]. Ключевым этапом при разработке методики анализа является выбор оптимальной процедуры обработки проб, позволяющей максимально удалить компоненты, мешающие определению, и выделить целевой аналит. Подготовка биообразцов для ВЭЖХ-анализа различных лекарственных препаратов направлена прежде всего на разрушение клеточных структур и дальнейшее удаление белковых и липидных компонентов.

Выделяют три основных способа подготовки биообразцов: жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ), твердофазная экстракция (ТФЭ) и осаждение белков [2–5].

ЖЖЭ предполагает либо экстракцию аналита в слой органического растворителя (этилацетата, диэтилового эфира, хлороформа и др.), не смешивающегося с гидрофильной средой пробы (плазмы крови, гомогената тканей или органов), либо иной комплекс манипуляций, связанный с распределением анализируемого соединения между двумя несмешивающимися жидкостями. Для улучшения экстракции в зависимости от свойств аналита может быть рациональным создание определенного рН гидрофильной среды. Метод ЖЖЭ является достаточно специфичным (не универсальным) способом, поскольку для каждого аналита необходимо подобрать оптимальные условия — экстрагент, рН среды, соотношение двух фаз, время обработки и т.п. При применении данного метода обычно удается получить достаточно чистые пробы, минимизировать влияние нативных компонентов биопроб, однако метод длителен, требует значительного расхода токсичных органических растворителей и имеет ограниченное применение (не для всех аналитов можно подобрать подходящий экстрагент и условия экстракции).

Метод ТФЭ предполагает нанесение проб на картридж с сорбентом и последовательное пропускание через него различных растворителей, элюирующих отдельно примеси и целевой аналит. Некоторые разновидности метода можно считать вариантом ЖЖЭ, однако более экономичным с точки зрения расхода растворителей и временных затрат. К числу преимуществ относят также возможность автоматизации

пробоподготовки как в офлайн, так и в онлайн (встроенном в ВЭЖХ-систему) режимах. Считают, что ТФЭ позволяет получать более очищенные пробы по сравнению с другими методами, поэтому она получила в настоящее время достаточно широкое распространение в практике хроматографического анализа [2, 3]. Основным недостатком является высокая стоимость картриджей, а также их неуниверсальность. Коммерчески доступно большое количество различных типов картриджей, отличающихся сорбентами и, соответственно, механизмами взаимодействия с примесями и целевым компонентом, предусматривающими различные протоколы работы с ними. С одной стороны, это положительный факт — можно подобрать оптимальный картридж/режим в зависимости от свойств аналита и матрицы. С другой стороны, с учетом относительно высокой стоимости данного типа расходных материалов при отсутствии утвержденных процедур для конкретного соединения разработка методики пробоподготовки на основании данных литературы и рекомендаций производителя картриджей становится достаточно ресурсоемкой и затруднительной. Один из возможных путей решения — использование универсальных картриджей, предлагаемых производителями¹.

Осаждение белков является наиболее простым, универсальным и достаточно эффективным способом подготовки биообразцов к ВЭЖХ-анализу как по мнению авторов [6], так и согласно рекомендациям производителей хроматографического оборудования и расходных материалов². В качестве осадителей обычно используют кислые растворы (трихлоруксусная, трифторуксусная кислоты), метанол, ацетонитрил, реже соли и другие реагенты. Метанол и ацетонитрил используют наиболее часто, поскольку эти растворители хорошо смешиваются с гидрофильной средой биопроб (плазмы крови), легко удаляются (процедура пробоподготовки часто предусматривает замену растворителя, необходимую для компенсации разбавления пробы осадителем), оптимальны для последующего повторного растворения проб и совместимы с элюентами, используемыми в ВЭЖХ.

Метод ВЭЖХ с ультрафиолетовым (УФ) детектированием является удобным, эффективным и достаточно экспрессным методом для анализа лекарственных веществ в биопробах [1, 5, 7]. Основное ограничение связано со значимым фоновым влиянием матриц биопроб, ограничивающим чувствительность ВЭЖХ-УФ-методик для большинства аналитов³ на уровне концентраций порядка 50–100 нг/мл [5, 7]. Вариант ВЭЖХ с масс-спектрометрическим (МС) детектированием является более чувствитель-

¹ Improve your LC/MC analysis with Phree phospholipid removal solutions. Phenomenex, USA; 2014.

Phree™ phospholipid removal solutions. General Protocol. Phenomenex, USA; 2013.

² Majors RE. Sample preparation fundamentals for chromatography. Wilmington: Agilent Technologies; 2014.

³ Комаров ТН. Изучение фармакокинетики противоопухолевых препаратов с помощью методов ВЭЖХ-МС и ГХ-МС: дис. ... канд. фарм. наук. М.; 2015.

Таблица 1. Условия подготовки проб плазмы крови

Table 1. Conditions for the preparation of blood plasma samples

№ пробы Sample No.	Осадитель (соотношение плазма:осадитель, по объему) Precipitation agent (plasma:precipitation agent, v/v)	Центрифугирование Centrifugation		Использование твердофазной экстракции SPE
		Скорость (об/мин) Speed (rpm)	Время (мин) Time (min)	
1	Ацетонитрил (1:3) Acetonitrile (1:3)	3000	15	Нет/No
2				Да/Yes
3		10 000	15	Нет/No
4				Да/Yes
5	Метанол (1:4) Methanol (1:4)	3000	15	Нет/No
6				Да/Yes
7		10 000	15	Нет/No
8				Да/Yes

ным и селективным, чем ВЭЖХ-УФ, но и существенно более дорогим методом. Снижение фонового сигнала за счет различных способов подготовки проб позволило бы повысить чувствительность ВЭЖХ-УФ метода, являющегося значительно более доступным, чем вариант ВЭЖХ-МС.

Цель работы — оценка влияния условий пробоподготовки и режима хроматографирования на уровень фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе плазмы крови человека и лабораторных животных (на примере крыс и кроликов).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована гепаринизированная плазма крови интактных животных (половозрелых самцов крыс и кроликов), хранившаяся в замороженном виде при -20°C . Образцы были получены в рамках экспериментальных исследований, проводимых в ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации» и одобренных на заседаниях биоэтической комиссии, согласно нормативным документам, регулирующим проведение доклинических исследований с использованием лабораторных животных (ГОСТ 33044-2014; Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 и др.). В качестве плазмы крови человека использована референтная нормальная пулированная плазма (ООО «Технология стандарт», Россия).

Для каждого типа плазмы было подготовлено по 8 проб, не менее чем в двукратной повторности каждая. Особенности пробоподготовки представлены в таблице 1, общая схема была следующей: в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 2 мл (типа «Эппендорф») помещали 0,2 мл плазмы крови, прибавляли осадитель (0,6 мл ацетонитрила или 0,8 мл метанола), встряхивали в течение 30 с на шейкере Vortex-2 (ИКА, Германия). Затем пробы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин (центрифуга лабораторная медицинская LMC-3000, ООО «BioSan»,

Латвия) или при 10 000 об/мин (микроцентрифуга Z 216 V-2, Hermle Labortechnik GmbH, Германия). Надосадочную жидкость отделяли, для проб 2, 4, 6 и 8 пропускали через картридж Phree Phospholipid Removal вместимостью 1 мл (кат. № 8B-S133-TAK, серия S417-0036, Phenomenex, США) с помощью 12-позиционной установки для ТФЭ (Phenomenex, США). Далее для всех проб растворитель удаляли, к сухому остатку прибавляли 0,2 мл метанола, встряхивали на шейкере Vortex-2 (ИКА, Германия) в течение 30 с, пробу переносили в виалу для автосамплера и дозировали в ВЭЖХ-систему.

Анализ выполнен на жидкостном хроматографе высокого давления LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором и колонкой Luna[®] C18(2) 150×4,6 мм (размер частиц сорбента 5 мкм) и предколонкой (3 мм), заполненной тем же сорбентом (Phenomenex, США), элюирование проводили смесью 0,03% раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ) (фаза А) и ацетонитрила (фаза Б) в трех хроматографических режимах:

- режим 1 — градиентный (табл. 2);
- режим 2 — изократический, соотношение фаз А:Б 75:25 (для гидрофильных аналитов);
- режим 3 — изократический, соотношение фаз А:Б 35:65 (для гидрофобных аналитов).

Скорость подачи элюента 1 мл/мин, дозируемый объем пробы 20 мкл, детектирование — диодно-матричное сканирование в диапазоне длин волн 220–340 нм, обработка хроматограмм выполнена при длинах волн 220, 254 и 295 нм.

Регистрация и обработка хроматограмм выполнена с помощью программного обеспечения LabSolution (Shimadzu, Япония). В качестве критерия количественной оценки фонового сигнала выбрана суммарная площадь всех пиков, зарегистрированных на хроматограмме. Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение Microsoft Office Excel 2007.

Таблица 2. Градиентный режим элюирования**Table 2.** Gradient elution mode

Время, мин Time, min	Фаза А Phase A	Фаза Б Phase B
0	80	20
10	35	65

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные элементы аналитической процедуры выбраны нами на основании ретроспективного анализа и систематизации собственного экспериментального опыта по разработке и валидации биоаналитических методик для нескольких десятков различных фармацевтических субстанций синтетического происхождения (более 50 веществ). Базовые варианты пробоподготовки (осаждение ацетонитрилом или метанолом) с последующей заменой растворителя оказались эффективны примерно в 64% случаев; смеси 0,03% раствора ТФУ и ацетонитрила использованы в качестве элюента примерно в 47% случаев; изократические режимы удалось подобрать для 68% объектов. На основании накопленной информации был выбран один усредненный градиентный режим (режим 1, табл. 2) и два изократических режима с меньшим и большим содержанием органического компонента (ацетонитрила) в составе элюента, условно ориентированные на анализ более гидрофильных (режим 2) и более гидрофобных (режим 3) целевых аналитов. Также были выбраны три волны детектирования (220, 254 и 295 нм), относящиеся к трем наиболее часто используемым областям УФ-спектров (205–220, 220–254 и 270–295 нм). Соотношения плазма:осадитель 1:3 для ацетонитрила и 1:4 для метанола выбраны в связи с тем, что в ходе предварительных исследований для этих вариантов установлена наиболее полная очистка от белка, а также они рекомендованы в инструкции по использованию картриджей для ТФЭ⁴.

Для всех видов плазмы и для всех режимов элюирования наблюдали схожую хроматографическую картину: в начальной области (первые 3 мин анализа) регистрировали группу достаточно интенсивных, плохо разделенных пиков наиболее гидрофильных и наименее удерживаемых компонентов, далее по всей хроматограмме регистрировали значительное количество минорных пиков и колебаний базовой линии, сумму площадей которых (в условных единицах интегратора, усл. ед.) считали суммарным фоновым сигналом (рис. 1).

В таблице 3 представлены полученные результаты оценки уровня фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе в трех хроматографических режимах при трех длинах волн проб трех типов плазмы крови

(крысы, кролика и человека) с использованием различных условий пробоподготовки.

Сопоставление данных, представленных в таблице 3, позволяет сделать ряд следующих заключений. Суммарное значение фонового сигнала зависит от природы биообразцов, по крайней мере, для трех исследованных видов плазмы крови. Например, для градиентного режима (режим 1) при длине волны детектирования 220 нм получены значения около $(17-40) \times 10^6$ усл. ед. для плазмы крови крысы, около $(22-36) \times 10^6$ усл. ед. для плазмы крови кролика и около $(20-25) \times 10^6$ усл. ед. для плазмы крови человека. На рисунке 2 представлена диаграмма, иллюстрирующая средние значения фонового сигнала для различных видов плазмы крови при трех длинах волн детектирования по результатам анализа в режиме 1. Схожие изменения наблюдали в других режимах хроматографирования и для других длин волн детектирования.

Полученные данные в целом свидетельствуют о том, что уровень фонового сигнала плазмы крови кролика имеет тенденцию к снижению по сравнению с аналогичным параметром плазмы крови крысы (на 10–53%). То есть использование кроликов в качестве тест-системы для фармакокинетических исследований при возможности выбора биологической модели предпочтительнее с точки зрения дальнейшего анализа биообразцов. Отметим, что для плазмы крови человека были получены наиболее низкие значения фонового сигнала (на 30–70% ниже, чем для плазмы крови крысы). Кроме того, для плазмы крови человека во всех случаях наблюдали более узкий диапазон значений, а для проб плазмы крови крысы — наиболее широкий. Таким образом, суммарный фоновый сигнал плазмы крови кролика ближе по значениям к аналогичному параметру плазмы крови человека по сравнению с плазмой крови крысы. Это подтверждает преимущества использования данного вида лабораторных животных в доклинических исследованиях, предполагающих анализ содержания лекарственного вещества в образцах плазмы крови. Наиболее часто эту задачу ставят в экспериментах по изучению фармакокинетики и токсикокинетики лекарственных препаратов, для которых основными биологическими тест-системами являются крысы и кролики.

Увеличение длины волны позволяет снизить уровень фонового сигнала для всех видов плазмы крови во всех использованных режимах. Так, например, для проб плазмы крови крысы в градиентном режиме (режим 1) уровень фонового сигнала составил около $(17-40) \times 10^6$ усл. ед. с детектированием при 220 нм, около $(0,8-13) \times 10^6$ усл. ед. с детектированием при 254 нм и около $(0,9-13) \times 10^6$ усл. ед. с детектированием при 295 нм (рис. 2). Аналогичные

⁴ Improve your LC/MC analysis with Phree phospholipid removal solutions. Phenomenex, USA; 2014.
Phree™ phospholipid removal solutions. General Protocol. Phenomenex, USA; 2013.

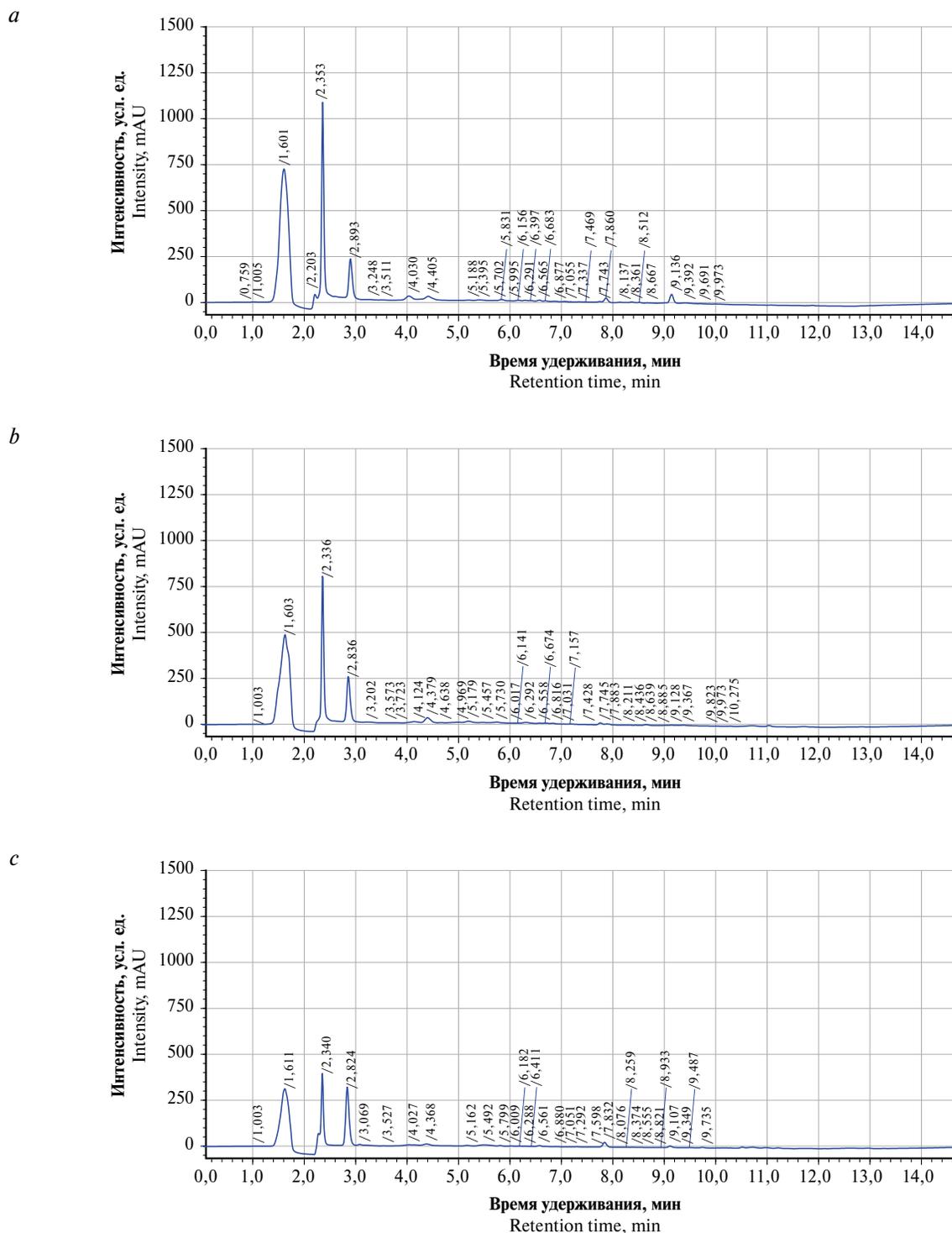


Рис. 1. Типичные хроматограммы образцов плазмы крови после обработки ацетонитрилом, без твердофазного экстрагирования, с центрифугированием при 3000 об/мин, условия анализа: колонка Luna® C18(2) 150×4,6 мм (5 мкм), элюирование смесью 0,03% трифторуксусная кислота — ацетонитрил в градиентном режиме от 20 до 65% ацетонитрила за 10 мин, скорость потока 1 мл/мин, детектирование при 220 нм: (а) плазма крови крысы; (б) плазма крови кролика; (с) плазма крови человека

Fig. 1. Typical chromatograms of blood plasma samples after treatment with acetonitrile, without solid phase extraction, centrifuged at 3000 rpm; chromatographic conditions: Luna® C18(2) column 150×4.6 mm (5 μm), elution with 0.03% trifluoroacetic acid—acetonitrile in a gradient elution mode from 20 to 65% acetonitrile in 10 minutes, flow rate of 1 mL/min, detection at 220 nm: (a) rat plasma; (b) rabbit plasma; (c) human plasma

Таблица 3. Значения суммарного фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе проб плазмы крови ($\times 10^6$ усл. ед., $\bar{X} \pm SD$, $n = 2$)Table 3. Total background signal in HPLC-UV analysis of blood plasma samples ($\times 10^6$ mAU \times c, $\bar{X} \pm SD$, $n = 2$)

Проба Sample	Режим 1 / Mode 1			Режим 2 / Mode 2			Режим 3 / Mode 3		
	220 нм / nm	254 нм / nm	295 нм / nm	220 нм / nm	254 нм / nm	295 нм / nm	220 нм / nm	254 нм / nm	295 нм / nm
Плазма крови крысы / Rat blood plasma									
1	30,0 \pm 1,0	6,52 \pm 0,02	7,01 \pm 0,06	26,2 \pm 0,6	6,44 \pm 0,14	6,68 \pm 0,08	23,2 \pm 1,2	7,96 \pm 0,10	7,77 \pm 0,07
2	27,2 \pm 0,1	5,08 \pm 0,02	5,54 \pm 0,01	23,8 \pm 0,1	5,12 \pm 0,03	5,31 \pm 0,02	17,5 \pm 0,2	5,90 \pm 0,11	5,86 \pm 0,10
3	27,2 \pm 0,1	5,23 \pm 0,09	5,67 \pm 0,07	22,6 \pm 1,9	5,24 \pm 0,02	5,44 \pm 0,03	18,1 \pm 0,1	6,20 \pm 0,04	6,02 \pm 0,04
4	17,2 \pm 0,7	0,75 \pm 0,01	0,88 \pm 0,01	10,2 \pm 1,0	0,99 \pm 0,07	1,00 \pm 0,03	5,42 \pm 0,04	1,09 \pm 0,01	1,03 \pm 0,02
5	31,4 \pm 1,2	7,82 \pm 0,03	7,89 \pm 0,01	28,3 \pm 1,1	7,93 \pm 0,25	7,88 \pm 0,04	23,6 \pm 0,1	9,32 \pm 0,15	9,02 \pm 0,01
6	40,0 \pm 0,1	12,9 \pm 0,1	12,6 \pm 0,1	35,3 \pm 0,9	12,2 \pm 0,5	11,7 \pm 0,3	30,6 \pm 0,1	14,7 \pm 0,1	13,6 \pm 0,1
7	40,4 \pm 0,5	13,2 \pm 0,1	13,3 \pm 0,1	36,8 \pm 1,4	13,6 \pm 0,1	13,3 \pm 0,2	34,6 \pm 0,5	15,1 \pm 0,2	14,5 \pm 0,2
8	25,4 \pm 0,3	3,92 \pm 0,01	4,09 \pm 0,09	19,4 \pm 0,4	4,16 \pm 0,10	4,24 \pm 0,06	15,2 \pm 0,1	4,57 \pm 0,05	4,53 \pm 0,04
Плазма крови кролика / Rabbit blood plasma									
1	26,2 \pm 0,2	3,96 \pm 0,01	3,01 \pm 0,04	21,8 \pm 0,2	4,11 \pm 0,01	2,97 \pm 0,01	13,7 \pm 2,3	4,09 \pm 0,89	2,93 \pm 0,65
2	25,3 \pm 0,3	3,52 \pm 0,01	2,78 \pm 0,01	20,8 \pm 1,3	3,78 \pm 0,03	2,87 \pm 0,01	15,8 \pm 0,1	4,62 \pm 0,04	3,44 \pm 0,04
3	22,3 \pm 0,1	1,75 \pm 0,09	0,82 \pm 0,01	18,8 \pm 0,1	2,02 \pm 0,02	1,02 \pm 0,03	12,7 \pm 0,1	2,30 \pm 0,02	1,17 \pm 0,09
4	26,5 \pm 0,1	4,77 \pm 0,02	4,46 \pm 0,01	22,6 \pm 0,2	4,78 \pm 0,08	4,26 \pm 0,07	16,0 \pm 0,1	5,56 \pm 0,10	4,87 \pm 0,01
5	28,8 \pm 0,1	5,88 \pm 0,02	4,74 \pm 0,02	25,3 \pm 0,3	6,03 \pm 0,08	4,67 \pm 0,07	19,6 \pm 0,3	7,10 \pm 0,06	5,49 \pm 0,05
6	23,9 \pm 0,1	2,70 \pm 0,02	1,89 \pm 0,15	18,4 \pm 0,1	2,90 \pm 0,06	2,09 \pm 0,14	13,8 \pm 0,1	3,32 \pm 0,01	2,38 \pm 0,02
7	28,3 \pm 0,1	5,24 \pm 0,08	4,08 \pm 0,02	24,3 \pm 0,2	5,40 \pm 0,01	4,06 \pm 0,05	18,7 \pm 0,3	6,30 \pm 0,11	4,73 \pm 0,06
8	35,8 \pm 0,1	10,35 \pm 0,03	9,39 \pm 0,06	19,4 \pm 0,4	4,16 \pm 0,10	4,24 \pm 0,06	27,2 \pm 0,4	12,2 \pm 0,2	10,4 \pm 0,1
Плазма крови человека / Human blood plasma									
1	20,9 \pm 0,1	1,60 \pm 0,01	1,90 \pm 0,01	14,2 \pm 1,9	2,11 \pm 0,31	2,25 \pm 0,03	10,8 \pm 0,2	3,10 \pm 0,01	2,66 \pm 0,02
2	20,6 \pm 0,1	1,49 \pm 0,01	1,91 \pm 0,01	13,0 \pm 1,1	1,69 \pm 0,01	2,01 \pm 0,01	11,6 \pm 0,1	3,02 \pm 0,01	2,57 \pm 0,03
3	22,1 \pm 0,1	2,06 \pm 0,09	2,18 \pm 0,01	16,1 \pm 0,6	2,42 \pm 0,01	2,31 \pm 0,01	13,1 \pm 0,2	3,50 \pm 0,01	2,90 \pm 0,01
4	21,3 \pm 0,1	1,59 \pm 0,01	1,63 \pm 0,01	13,7 \pm 0,6	1,85 \pm 0,01	1,90 \pm 0,01	10,6 \pm 0,1	2,42 \pm 0,03	2,18 \pm 0,03
5	20,2 \pm 0,1	1,55 \pm 0,01	1,56 \pm 0,01	14,8 \pm 1,0	1,84 \pm 0,03	1,86 \pm 0,04	11,8 \pm 0,2	3,40 \pm 0,02	2,57 \pm 0,03
6	21,4 \pm 0,1	1,91 \pm 0,10	1,84 \pm 0,01	13,8 \pm 0,1	2,32 \pm 0,03	1,98 \pm 0,01	12,7 \pm 0,5	2,98 \pm 0,03	2,44 \pm 0,01
7	20,5 \pm 0,3	2,12 \pm 0,09	2,08 \pm 0,01	16,2 \pm 1,1	2,58 \pm 0,01	2,37 \pm 0,01	12,9 \pm 0,1	4,22 \pm 0,03	3,17 \pm 0,05
8	24,7 \pm 0,1	4,08 \pm 0,26	4,26 \pm 0,05	19,8 \pm 0,1	4,55 \pm 0,05	4,38 \pm 0,03	15,0 \pm 0,1	5,70 \pm 0,10	5,03 \pm 0,02

Примечание. $\bar{X} \pm SD$ — среднее значение суммарного фонового сигнала и стандартное отклонение для числа испытаний n .
Note. $\bar{X} \pm SD$ —mean total background signal, and standard deviation for n tests.

изменения наблюдали в других режимах хроматографирования, а также для других типов плазмы крови. Снижение уровня сигнала при переходе от 220 к 254 или 295 нм достаточно существенное — для плазмы крови крысы в среднем в 3–4 раза, для плазмы крови кролика — в 5–6 раз и более, для плазмы крови человека — в 5–13 раз. В то же время уровень фонового сигнала при 254 и 295 нм примерно одинаков. То есть при выборе длины волны детектирования для минимизации фонового влияния матрицы важно сместиться из ближневолнового диапазона (205–220 нм) в более длинноволновую область. Дальнейший выбор конкретной длины волны в большей степени зависит от свойств целевого аналита (положение максимума в УФ-спектре), чем от фонового

влияния матрицы. Влияние выбора длины волны на величину фонового сигнала наиболее выражено для плазмы крови человека.

Уровень фонового сигнала в градиентном режиме хроматографирования образцов и в изократических режимах приблизительно одинаков. Так, на примере проб плазмы крови крыс уровень фонового сигнала с детектированием при 220 нм составил около $(17–40) \times 10^6$ усл. ед. для режима 1, около $(10–37) \times 10^6$ усл. ед. для режима 2 и около $(5,5–35) \times 10^6$ усл. ед. для режима 3. Схожие уровни сигнала были получены и на других длинах волн для трех типов плазмы крови. Следовательно, выбор хроматографического режима для биоаналитических исследований определяется прежде всего свойствами

целевого аналита, и влияние условий элюирования на величину фонового сигнала матрицы незначительно.

Для проб после пробоподготовки с ацетонитрилом (пробы 1–4 для каждого из трех типов плазмы крови) уровень фонового сигнала несколько меньше, чем для проб после пробоподготовки с метанолом (пробы 5–8). Так, для проб плазмы крови крысы в градиентном режиме (режим 1) с детектированием при 220 нм уровень фонового сигнала составил $(25,4 \pm 5,2) \times 10^6$ усл. ед. при обработке ацетонитрилом и $(34,3 \pm 6,7) \times 10^6$ усл. ед. при обработке метанолом (различия статистически достоверны при уровне значимости $p = 0,05$). Аналогичные изменения наблюдали независимо от режимов хроматографирования, типа плазмы крови и длин волн детектирования.

Изменение режима центрифугирования — 3000 об/мин (пробы 1, 2, 5, 6) или 10 000 об/мин (пробы 3, 4, 7, 8) — в целом не оказывает значимого влияния на уровень фонового сигнала. Только для проб плазмы крови крысы, обработанных ацетонитрилом, выявлено некоторое снижение уровня фонового сигнала при увеличении скорости центрифугирования — $(27–30) \times 10^6$ усл. ед. для проб 1, 2 (3000 об/мин) и $(17–27) \times 10^6$ усл. ед. для проб 3, 4 (10 000 об/мин, на примере режима 1 при длине волны детектирования 220 нм). Для проб, обработанных метанолом, а также для других типов плазмы крови снижения уровня фонового сигнала при более жестких условиях центрифугирования не выявлено. То есть применение более производительного оборудования для улучшения качества очистки биопроб для ВЭЖХ-УФ-анализа в общем случае нецелесообразно.

Введение в процедуру пробоподготовки стадии ТФЭ не оказало существенного влияния на уровень фонового сигнала. При сопоставлении данных, полученных без ТФЭ (пробы 1, 3, 5, 7) и с ТФЭ (пробы 2, 4, 6, 8), для трех типов плазмы с применением двух типов осадителей и двух режимов центрифугирования для некоторых пар проб отмечено снижение уровня фонового сигнала; для других получены схожие значения, а в ряде случаев выявлено повышение уровня фонового сигнала. По-видимому, выявленные отличия носили случайный характер, не позволили выявить строгих закономерностей, и следует заключить, что процедура ТФЭ не оказала существенного влияния на уровень фонового сигнала. Учитывая высокую стоимость картриджей, являющихся индивидуальным расходным материалом для каждой пробы (вопросы регенерации картриджей требуют отдельного обсуждения и экспериментального подтверждения), данный подход, по крайней мере, в рассмотренном сочетании (тип картриджа и тип детектирования) не является вариантом выбора. Более простые, традиционные

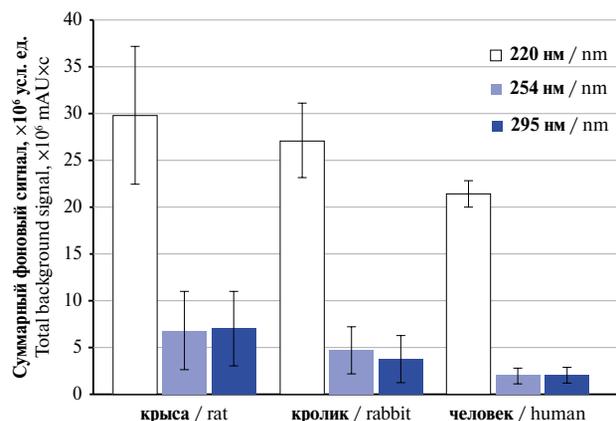


Рис. 2. Средние значения суммарного фонового сигнала для плазмы крови различных биологических видов при различных длинах волн детектирования на примере результатов анализа в градиентном режиме элюирования. Условия анализа те же, что указаны на рис. 1, вертикальными отрезками обозначены стандартные отклонения для числа испытаний $n = 16$

Fig. 2. Mean total background signal for blood plasma of different biological species at various detection wavelengths in the gradient elution mode. The chromatographic conditions were the same as shown in Fig. 1, the vertical error bars represent the standard deviations of the tests ($n = 16$)

приемы осадительной подготовки проб позволяют достаточно полно очистить биообразцы от компонентов матрицы для последующего ВЭЖХ-анализа с УФ-детектированием.

Считают, что при подготовке биообразцов к дальнейшему ВЭЖХ-анализу необходимо очистить пробы от двух основных групп мешающих эндогенных компонентов — белков и липидных соединений, включающих моно-, ди-, триглицериды и фосфолипиды⁵. Основным и наиболее простым способом избавления от белков является их осаждение. Для очистки от фосфолипидов мы применяли картриджи для ТФЭ, специально предназначенные для этой процедуры. Оказалось, что в случае ВЭЖХ с УФ-детектированием дополнительная очистка от фосфолипидов не снижает уровень фонового сигнала. Именно фосфолипиды (а также соли органических и неорганических кислот) считают причиной так называемого «матричного эффекта», искажающего интенсивность сигнала целевого аналита при ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием [8]. По-видимому, именно для их устранения эффективны варианты пробоподготовки с ТФЭ, получившие широкое распространение в биоаналитических методиках с этим типом детектирования. Можно предположить, что в варианте УФ-детектирования фоновый сигнал обусловлен компонентами не белковой (их осадили) и не фосфолипидной (их удаление не дает положительного эффекта), а какой-то иной природы (ионы, витамины, короткие пептиды, нуклеиновые фрагменты и др.).

⁵ Improve your LC/MC analysis with Pree phospholipid removal solutions. Phenomenex, USA. 2014. 6 p. Phree™. Phospholipid removal solutions. General Protocol. Phenomenex, USA. 2013. 12 p.

Рассмотренные факторы можно условно разделить на две группы: связанные с процедурой подготовки проб (осадитель, условия центрифугирования, включение стадии ТФЭ) и связанные с условиями хроматографического анализа (режим, длина волны детектирования). Среди первой группы факторов наибольшее значение для снижения фонового сигнала имеет выбор реагента для осаждения белков — предпочтительнее использовать ацетонитрил. Во второй группе факторов ключевое значение имеет выбор длины волны детектирования — необходимо стремиться выбирать длину волны в области специфического поглощения целевого аналита, что зависит от природы и свойств анализируемого соединения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования рассмотрено влияние природы осадителя, режима центрифугирования, включения стадии твердофазной экстракции в процедуру подготовки проб трех типов плазмы крови (крысы, кролика, человека) на уровень фонового сигнала при анализе методом ВЭЖХ-УФ в трех хроматографических режимах при трех длинах волн. Установлено, что уровень фонового сигнала для плазмы крови человека и кролика имеет тенденцию к снижению по сравнению с плазмой крови крыс. Фоновый сигнал практически не зависит от хроматографического режима, интенсивности центрифугирования и введения стадии ТФЭ. Наибольшее влияние на уровень фонового

сигнала оказывают выбор осадителя при пробоподготовке (ацетонитрил предпочтительнее, чем метанол) и выбор длины волны детектирования (следует по возможности избегать ближневолновой области). Выявленные особенности процедуры подготовки проб и условий хроматографического анализа могут быть использованы при разработке и валидации биоаналитических методик, применяемых в доклинических и клинических исследованиях.

Вклад авторов. В. М. Косман — планирование исследования, сбор, обработка и систематизация экспериментальных данных, написание и доработка текста; М. В. Карлина — идея и дизайн исследования, консультации по проведению отдельных этапов экспериментальных работ, доработка текста; О. Н. Пожарицкая — концепция исследования, интерпретация результатов, критический пересмотр текста публикации.

Authors' contributions. Vera M. Kosman—planning of the study, collection, processing and systematisation of experimental data, writing and revision of the text; Marina V. Karlina—elaboration of the study idea and design, consultation on individual stages of experimental work, finalization of the text; Olga N. Pozharitskaya—elaboration of the study concept, interpretation of the results, revision of the text.

Благодарности. Работа выполнена в рамках инициативного исследования, без финансовой поддержки.

Acknowledgements. The article describes the results of an independent research project which was carried out without financial support.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Wada M, Alkhalil SM, Nakashima K. Current HPLC methods for determination of medicaments in formulations and biological samples. *JJPS*. 2008;1(1):1–27.
- Медведев ЮВ, Раменская ГВ, Шохин ИЕ, Ярушок ТА. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2013;47(4):45–51. [Medvedev YuV, Ramenskaya GV, Shokhin IE, Yarushok TA. HPLC and UPLC for determining drugs in blood (a review). *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013;47(4):45–51 (In Russ.)]
- Blahova E, Brandsteterova E. Approaches in sample handling before HPLC analysis of complex matrices. *Chem Pap*. 2004;58(5):362–73.
- Prabu SL, Suriyaprakash TNK. Extraction of drug from the biological matrix: a review. In: Naik GR, ed. *Applied biological engineering—principles and practice*. Rijeka: InTech; 2012. P. 479–506. <https://doi.org/10.5772/32455>
- Рейхарт ДВ, Чистяков ВВ. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях. *Казанский медицинский журнал*. 2010;91(4):532–6. [Reikhart DV, Chistyakov VV. Analysis of drugs in pharmacokinetic studies. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*. 2010;91(4):532–6 (In Russ.)]
- Alshammari TM, Al-Hassan AA, Hadda TB, Aljofan M. Comparison of different serum sample extraction methods and their suitability for mass spectrometry analysis. *Saudi Pharm J*. 2015;23(6):689–97. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.01.023>
- Рейхарт ДВ, Чистяков ВВ. Высоочувствительные аналитические методы в оценке биоэквивалентности лекарственных препаратов (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2009;43(12):39–46. [Reikhart DV, Chistyakov VV. High-sensitivity analytical methods for estimating the bioequivalence of drugs. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2009;43(12):39–46 (In Russ.)]
- Ярошенко ДВ, Карцова ЛА. Матричный эффект и способы его устранения в биоаналитических методиках, использующих хромато-масс-спектрометрию. *Журнал аналитической химии*. 2014;69(4):351–8. [Yaroshenko DV, Kartsova LA. Matrix effect and methods for its elimination in bioanalytical methods using chromatography-mass spectrometry. *Zhurnal analiticheskoy khimii = Journal of Analytical Chemistry*. 2014;69(4):351–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.7868/s0044450214040136>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Косман Вера Михайловна, канд. фарм. наук. Vera M. Kosman, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>
Карлина Марина Валерьевна, канд. фарм. наук. Marina V. Karlina, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>
Пожарицкая Ольга Николаевна, канд. фарм. наук. Olga N. Pozharitskaya, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1061-0665>

Статья поступила 18.10.2019
После доработки 14.11.2019
Принята к печати 28.05.2020

Article was received 18 October 2019
Revised 14 November 2019
Accepted for publication 28 May 2020