

Новые подходы хроматографических и хромато-масс-спектрометрических методов в решении задач токсикологии

ВАРЗИЕВ Г.Б.

директор по продажам, ГК «Интераналит»; 117545, Москва, Варшавское ш., д.129, к.2

РОДИН И.А.

старший научный сотрудник, Московский государственный университет; 119992, Москва, Ленинские горы 1-3

Рассмотрены новые подходы в аналитической химии сильнодействующих препаратов. Рассмотрены комплексные решения для проведения скрининга, идентификации и количественного анализа различных классов соединений. Описаны программно-аппаратные комплексы и наборы готовых решений для хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Особое внимание уделено новым способам пробоподготовки биологических жидкостей.

Ключевые слова: токсикология, аналитическая химия, хроматография, хромато-масс-спектрометрия, скрининг, идентификация, анализ, пробоподготовка

Химический анализ в токсикологических исследованиях играет ключевую роль. Объектами для анализа здесь являются биоматериалы, что существенно усложняет его проведение. Особую сложность в таких исследованиях также представляет труднодоступность стандартных образцов, приобретение, хранение и использование которых затруднены в силу существующего законодательства. Основными направлениями совершенствования подходов аналитической химии в данной области являются развитие комплексных программно-аппаратных комплексов, предназначенных для прямой безэталонной идентификации и полуколичественного определения сильнодействующих препаратов. Вторым важным направлением для развития является автоматизация проводимых процедур, что ведет к снижению человеческого фактора, повышению производительности анализа и снижению расходов на проведение лабораторных исследований. Существенные успехи достигнуты в области создания современных высокочувствительных хромато-масс-спектрометров, обеспечивающих высокую чувствительность детектирования. Развитие метода тандемной хромато-масс-спектрометрии существенно облегчает проведение структурных исследований для новых препаратов и их метаболитов.

Одной из наиболее ярких мировых тенденций в данной области является повышение интереса к использованию жидкостной хромато-масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии. В отличие от метода газовой хромато-масс-спектрометрии, данные методы обладают целым рядом преимуществ, главным из которых является возможность проведения прямого анализа нелетучих органических соединений. В течение длительного времени использование данного метода сильно ограничивалось отсутствием библиотек масс-спектров, однако в настоящее время накоплены существенные по объему базы данных, использование

которых в сочетании с жидкостными хроматографами и хромато-масс-спектрометрами позволяет создавать программно-аппаратные комплексы, для решения задач токсикологии.

Подобные программно-аппаратные комплексы позволяют проводить обнаружение целевых компонентов благодаря использованию спектральных библиотек и проводить полуколичественный анализ благодаря использованию метода внутренних стандартов и пересчету по встроенным относительным калибровкам.

В качестве примера подобного программно-аппаратного комплекса можно привести решение компании Shimadzu (Япония) под названием TOX.I.S. II — TOXicological Identification System (рис. 1). Данный прибор построен на основе жидкостного хроматографа работающего в режиме градиентного элюирования и оснащенного диодно-матричным детектором. Система использует подвижные фазы фиксированного состава, что позволяет накопить и использовать архив



Рис. 1. Система для токсикологического скрининга TOX.I.S. II (Shimadzu, Япония).

спектральных и хроматографических данных для проведения скрининговых исследований.

Входящая в состав программно-аппаратного комплекса библиотека содержит 2682 УФ-спектра веществ, важных для токсикологии: наркотики; лекарственные препараты, вызывающие зависимость; антиэпилептики; важнейшие классы лекарств (анальгетики, стероиды, антибиотики, антигистаминные и др.); растительные яды; пестициды, фунгициды; гербициды; ПАУ, ПХБ и других важных соедине-

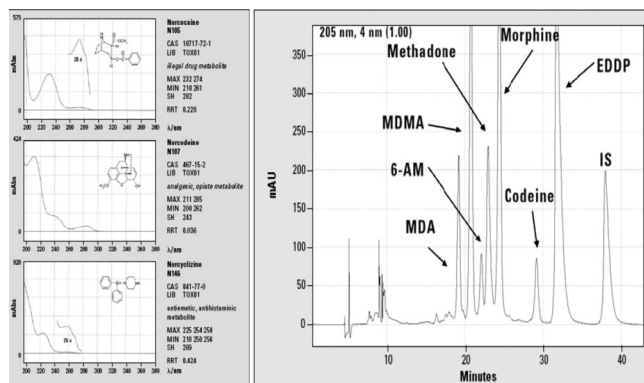


Рис. 2. Спектры поглощения и хроматограммы, полученные с помощью системы TOX.I.S. II.

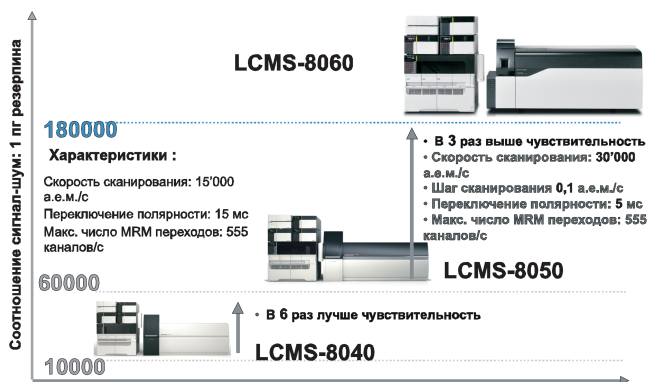


Рис. 3. Хромато-масс-спектрометры серии LCMS-80X0 компании Shimadzu.

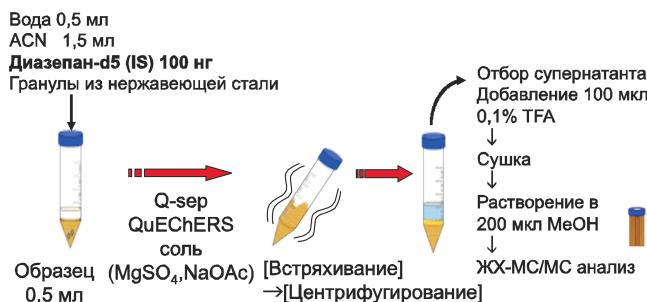


Рис. 4. Пробоподготовка для проведения скрининговых исследований методом ВЭЖХ-МС/МС.

ний. Спектры получены в интервале 195—380 нм, подвижная фаза: ацетонитрил/фосфатный буферный раствор (рН 2.3). Спектральные данные накоплены совместно с Inst. Forensic Medicine (Берлин). Для проведения безэталонной идентификации используются алгоритмы поиска по спектральной библиотеке, а также учитываются индексы удерживания целевых компонентов. Для проведения оценки содержания компонентов в исследуемых образцах, на стадии подготовки к анализу осуществляют внесение внутреннего стандарта, при этом в программном обеспечении имеются коэффициенты пересчета для оценки содержания искомым компонентом относительно внутреннего стандарта. Таким образом, использование данного программно-аппаратного комплекса позволяет проводить идентификацию большого набора важных с практической точки зрения соединений без использования стандартных образцов в различных объектах, включая порошки, растительные материалы и биожидкости. Прибор может быть использован для проведения быстрой диагностики острых отравлений, для первичного анализа неизвестных образцов.

Еще одним подходом к созданию готовых решений для токсикологического анализа является разработка готовых методик анализа сильнодействующих препаратов для метода ВЭЖХ-МС/МС. Использование метода ВЭЖХ-МС/МС обеспечивает высокую чувствительность детектирования целевых компонентов в режиме регистрации выбранных ионных переходов (MRM). Современные хромато-масс-спектрометры Shimadzu серии LCMS 80X0 типа «тройной квадруполь» обеспечивают высокую скорость регистрации спектральных данных, что позволяет обеспечивать одновременное измерение компонентов различной природы с быстрым переключением полярности регистрируемых ионов без снижения чувствительности. В полной мере реализована возможность проведения экспериментов с одновременной регистрацией в режиме MRM и записью полного спектра дочерних ионов. В линейке приборов серии LCMS 80X0 представлены приборы обеспечивающие приемлемый уровень чувствительности для рутинного анализа (LCMS 8040), приборы для высокочувствительного анализа (LCMS 8050) и приборы для ультраследового анализа (LCMS 8060). В настоящее время все приборы внесены в Государственный реестр средств измерения, LCMS 8040 и LCMS 8060 зарегистрированы в РФ как медицинское изделие.

Для проведения токсикологических исследований, данные хромато-масс-спектрометры могут быть укомплектованы наборами готовых методик: методикой для скрининга наркотических и сильнодействую-

щих препаратов на 106 веществ и методикой для определения 386 сильнодействующих препаратов различных классов. Данные наборы методик включают в себя условия ВЭЖХ разделения, параметры MRM, параметры сканирования дочерних ионов, библиотеку масс-спектров. Также готовая методика содержит в себе коэффициенты пересчёта для количественной оценки целевых компонентов, которые используются для анализа методом внутреннего стандарта.

Для упрощения процедуры пробоподготовки используется процедура QuEChERS (рис. 4).

Особую сложность при проведении поисковых исследований представляет собой пробоподготовка биологических жидкостей. Для проведения автоматизированной пробоподготовки образцов плазмы крови используется система ВЭЖХ с автоматизированной пробоподготовкой «CoSense», позволяющая проводить on-line пробоподготовку, направленную на удаление мешающих при анализе высокомолекулярных соединений. Для этого используется специализированная колонка-ловушка Shim-pack MAYI-ODS. Данная колонка изготовлена на основе силикагеля с иммобилизированной метилцеллюлозой и группами C18 на поверхности внутри пор (рис. 5). При нанесении образца биоматериала, молекулы низкомолекулярных физиологически-активных соединений сорбируются на группах C18 внутри пор, при этом большие молекулы биополимеров не способны проникать внутрь пор. Таким образом, обеспечивается твердофазное извлечение и концентрирование целевых компонентов, с одновременным удалением высокомолекулярных компонентов (рис. 6).

Особую сложность представляют собой поисковые задачи, направленные на выявление новых, ранее не описанных соединений. Наиболее мощным инструментом для такого рода исследований является метод тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с ВЭЖХ. Масс-спектры высокого разрешения позволяют проводить прямое определение брутто-формулы родительских и дочерних ионов, а использование техники тандемного эксперимента обеспечивает возможность установления структуры неизвестного вещества, изучая закономерности его фрагментации. Существенным ограничением современных приборов данного типа является возможность генерации только одного поколения дочерних ионов, что ограничивает возможности при дифференциации изомеров, а также установления позиции функциональных групп в молекуле. Данного недостатка лишен прибор LCMS-IT-TOF компании Shimadzu (Япония). Данный прибор относится к категории приборов гибридного типа и включает в себя два масс-анализатора: сферическую ионную ловушку, обеспечива-

ющую генерацию до 10 последовательных поколений дочерних ионов, и времяпролетный масс-анализатор с рефлектроном, обеспечивающий регистрацию масс-спектров родительских и дочерних ионов с высоким разрешением (рис. 7).

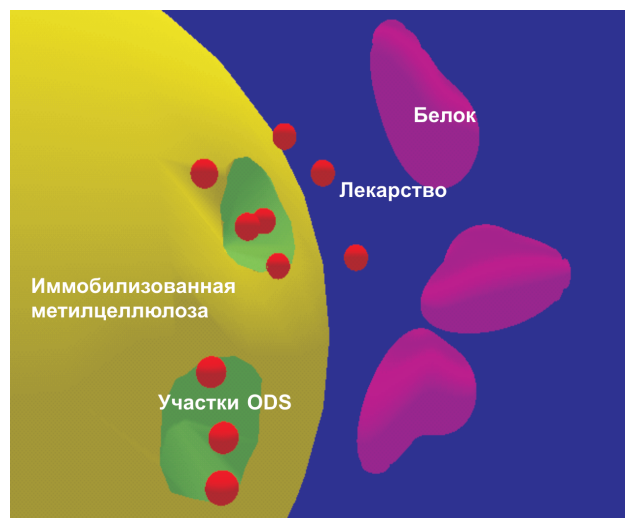


Рис. 5. Поверхность колонки Shim-pack MAYI-ODS.

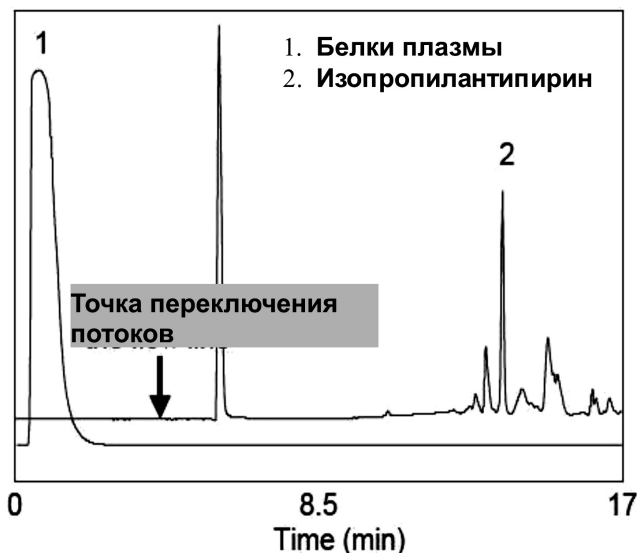


Рис. 6. «CoSense»: эффективная очистка от высокомолекулярных компонентов

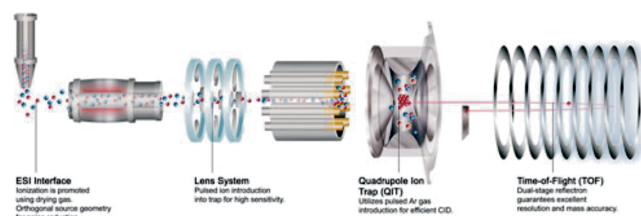


Рис. 7. Схема масс-спектрометра LCMS-IT-TOF Shimadzu.

Данная система комплектуется специализированными программными пакетами для интерпретации спектральных данных, установлению структуры, предсказания и поиска возможных метаболитов (учитываются до 16 возможных путей метаболизма).

Использование данного подхода позволяет получить максимум информации для установления структур неизвестных соединений.

Описанные в настоящем обзоре решения, представленные в последние годы, обеспечивают комплексное решение задач аналитической токсикологии. Ознакомиться с более подробными сведениями

о данных приборах можно, обратившись в компанию «ИнтерАналит», являющуюся генеральным дистрибьютором корпорации Shimadzu.

117545, г.Москва, Варшавское ш., д.129, корп.2

Офис-парк «Варшавский», 5 этаж, офис №511

Тел.: +7 (499) 709-81-01

Факс: +7 (495) 640-78-39

E-mail: info@analyt.ru

www.analyt.ru

NEW APPROACHES IN CHROMATOGRAPHY AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY METHODS IN TOXICOLOGICAL CHALLENGES

Varziev G.B., Rodin I.A.

The article considers new approaches in analytical chemistry of potent drugs. Complete solutions for screening, identification and quantification of different classes of compounds are discussed. Hardware and software systems and sets of ready-made solutions for chromatography and gas chromatography-mass spectrometry are described. Particular attention is paid to new methods of sample preparation of biological fluids.

Key words: toxicology, analytical chemistry, chromatography, chromatography-mass spectrometry, screening, identification, analysis, sample preparation