

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

ВЭЖХ И СВЭЖХ КАК МЕТОДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В КРОВИ (ОБЗОР)

Аналитические решения
Markets and Applications Programs

Авторы

Ю.В.Медведев, Г.В.Раменская,
И.Е.Шохин, Т.А.Ярушок

ГБОУ ВПО Первый МГМУ им.
И.М.Сеченова Минздрава
России



В статье описывается применение методов ВЭЖХ и СВЭЖХ в определении ЛВ в плазме при проведении исследований биоэквивалентности и клиническом мониторинге. Рассмотрены способы пробоподготовки, хроматографирования и детектирования, отмечены различия для каждого из методов.

Введение

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) стала новым этапом в развитии жидкостной хроматографии и возникла как результат появления новых высокоэффективных сорбентов. В настоящее время ВЭЖХ широко используется в анализе лекарственных веществ (ЛВ) и лекарственных средств (ЛС): для контроля качества, количественного определения действующих веществ и примесей, при мониторинге концентрации ЛВ в крови пациентов и при оценке биоэквивалентности. Метод сверхпроизводительной высокоэффективной (сверхэффективной) жидкостной хроматографии (СВЭЖХ, UPLC, ultra performance liquid chromatography) является развитием метода высокоэффективной хроматографии и характеризуется увеличением эффективности хроматографического разделения за счет применения хроматографических сорбентов с размером частиц менее 3 мкм. Применение малых частиц кроме увеличения эффективности приводит к увеличению разрешения между пиками, чувствительности (за счет сужения пиков), пиковой емкости, что в результате позволяет проводить большее число исследований за единицу времени в сравнении с ВЭЖХ. Необходимо отметить, что наибольшая эффективность от применения хроматографических колонок содержащих сорбенты малых размеров достигается при использовании специально разработанных хроматографов, к которым предъявляются специальные требования. Для насоса требуется высокая точность подачи растворителя при высоком давлении, которое прямо пропорционально скорости потока и размеру частиц. Автосамплер должен выдерживать подаваемый на него поток подвижной фазы и при этом обеспечивать безимпульсный ввод пробы,



а детектор, в связи с высокой разрешающей способностью системы, должен обладать малой ячейкой (в случае УФ-детектирования) и высокой скоростью измерений.

Метод СВЭЖХ на данный момент применяется чаще всего в исследованиях биоэквивалентности и при терапевтическом лекарственном мониторинге, то есть в случаях, когда нужно провести анализ большого числа проб за возможно малый промежуток времени. При проведении таких исследований наиболее подходящим способом детектирования является тандемная масс-спектрометрия.

ВЭЖХ в фармацевтической практике применяется гораздо чаще, чем СВЭЖХ. Метод включен в различные фармакопеи – ГФ XII издания, фармакопею США, Европейскую, Британскую, Японскую и др. и используется для контроля примесей и действующих веществ в НД. Кроме того, метод широко используется при исследованиях биоэквивалентности и др. Таким образом, как ВЭЖХ, так и СВЭЖХ могут быть использованы для решения одинаковых задач, но, очевидно, с различием на разных стадиях проведения анализа.

Пробоподготовка

Пробоподготовка является важным этапом в анализе ЛВ в плазме, который позволяет произвести удаление сопутствующих компонентов и концентрирование пробы. Основными сопутствующими веществами, мешающими проведению анализа методом ВЭЖХ и СВЭЖХ, являются белки, которые способны связываться с неподвижной фазой (НФ), в том числе необратимо, или коагулировать при взаимодействии с компонентами подвижной фазы (ПФ), в результате чего может нарушаться ток ПФ через капилляры хроматографа или хроматографическую колонку. Другими компонентами плазмы, мешающими проведению анализа, являются липиды, биогенные амины, клеточные структуры, форменные элементы (если их отделение от плазмы произвели некачественно) и пр. Данные компоненты плазмы, так же как и белки способны связываться с НФ или мешать току ПФ через колонку и капилляры.

В качестве пробоподготовки при проведении исследований методом ВЭЖХ или СВЭЖХ применяют следующие способы: жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ), твердофазная экстракция (ТФЭ), осаждение белков.

При проведении ЖЭ в качестве экстрагента чаще всего применяются органические растворители: этилацетат, диэтиловый эфир, гексан, дихлорметан, хлороформ и т.п. Жидкость-жидкостная экстракция может производиться при создании щелочной [1-4], кислой реакции среды [5-9], либо без специального создания pH [10-20]. После проведения процедуры экстракции производится удаление экстрагента при нагревании под током азота или производится упаривание под вакуумом. Далее следует процедура перерастворения сухого остатка в подходящем растворителе. Полученный раствор может быть введен в хроматограф [2, 5-7, 9, 11-13, 16], предварительно профильтрован [14] или подвергнут центрифугированию [1, 4, 8, 10, 20].

ТФЭ, как способ пробоподготовки, позволяет получать высокоочищенные пробы, содержащие малое количество посторонних веществ. Процедура ТФЭ

предполагает нанесение пробы на картридж с сорбентом, последовательное пропускание через картридж различных растворителей, которые элюируют посторонние вещества, далее пропускают растворитель элюирующий исследуемые вещества и производят упаривание элюата с последующим перерастворением сухого остатка [21-27]. В тех случаях, когда количество элюирующего растворителя невелико, или когда не требуется концентрирование полученного раствора, упаривание не производят [28, 29]. По трудоемкости ТФЭ сопоставима с ЖЖЭ, а часто сопровождается большим количеством этапов пробоподготовки чем ЖЖЭ.

Самым быстрым способом пробоподготовки плазмы для анализа методом ВЭЖХ или методом СВЭЖХ является осаждение белков. Данный способ пробоподготовки весьма быстр и прост. Осаждение белков может быть достигнуто созданием значений pH, при которых происходит коагуляция белка, например, к пробе добавляют кислоты (трифторуксусную, трихлоруксусную, перхлоруксусную) [30, 31]; к пробе плазмы могут быть добавлены смешивающиеся с водой органические растворители – метанол [32, 33], этанол, ацетонитрил [34-36], или соли металлов: цинка, свинца и др. Осаждение белков позволяет в некоторых случаях удалить до 98 % белков [37]. При выборе осаждающего реактива необходимо учитывать возможные реакции с определяемым ЛВ – гидролиз, комплексообразование и нерастворимость ЛВ в получившихся условиях. Следует учитывать процесс разбавления пробы, что может привести к недостаточной чувствительности или к увеличению объема вводимой в хроматограф пробы. Ввод в хроматографическую колонку сильноокислой пробы или пробы с существенно большим содержанием ацетонитрила или метанола, чем в ПФ, может сопровождаться изменением хроматографических параметров системы – времени миграции компонентов, снижении числа теоретических тарелок, симметрии пиков и других параметров пригодности. После осаждения белков их отделяют от надосадочной жидкости центрифугированием, после чего пробы вводятся в хроматограф. В редких

случаях пробы могут потребовать повторного центрифугирования или фильтрации. Необходимо отметить, что при использовании различных осаждающих реактивов достигается разная эффективность осаждения белков из плазмы [37], поэтому в пробе могут оставаться белки.

СВЭЖХ из-за применения капилляров меньшего диаметра по сравнению с ВЭЖХ и колонок с меньшим размером пор между частицами НФ более чувствительна к чистоте пробы. В связи с этим для СВЭЖХ часто добавляется дополнительный этап очистки пробы – дополнительное центрифугирование или фильтрование, что менее распространено в исследованиях методом ВЭЖХ и приводит к большим временным затратам и большей стоимости пробоподготовки из-за увеличения количества расходных материалов.

Одним отличием СВЭЖХ от ВЭЖХ, в первую очередь обусловленным способами детектирования, является наличие в некоторых ВЭЖХ-методиках [4, 19] стадии дериватизации. Дериватизация при определении ЛВ в плазме, как правило, требуется для соединений не обладающих характерным спектром поглощения в УФ или видимом диапазоне спектра, что значительно осложняет их детектирование. В ВЭЖХ существуют концентрационные детекторы, позволяющие проводить определение таких веществ – это рефрактометрический детектор и детектор по светорассеиванию, однако их чувствительность не достаточна для детектирования низких уровней ЛС в плазме. В таких случаях применяется модификация исследуемой молекулы с приданием ей свойства флуоресцировать, что позволяет произвести ее детектирование. Стадии дериватизации предшествует стадия жидкостной экстракции [4, 19], далее к экстракту добавляют дериватирующий агент, например дансилхлорид [4], хлорацетальдегид, ФМОС [19], и после завершения реакции проводят хроматографическое разделение. В некоторых СВЭЖХ методиках пробоподготовка также может включать стадию дериватизации [38], однако данный способ пробоподготовки в СВЭЖХ не распространен.

Хроматографирование

Стадия хроматографирования обычно описывается параметрами хроматографирования – размерами хроматографической колонки и характеристиками неподвижной фазы, температура термостата колонок, скорость потока подвижной фазы, состав подвижной фазы, объем вводимой пробы, время анализа одной пробы.

Хроматографическая колонка играет важную роль в хроматографическом процессе, поэтому ее параметры – длина и внутренний диаметр, размер частиц сорбента и тип сорбента, крайне важны. В ВЭЖХ исследованиях

длина используемой колонки варьируется от 5 до 25 см, а внутренний диаметр от 3 до 4,6 мм. Для СВЭЖХ характерно применение колонок с длиной от 3 до 10 см и внутренним диаметром от 1 до 2,1 мм. Колонки малой длины применяют для анализа сильно удерживаемых компонентов [11, 18, 33], для снижения расхода ПФ, сокращения времени анализа. Колонки большой длины применяют для анализа слабоудерживаемых компонентов [22, 23], в том числе при использовании ион-парных реагентов [29, 30, 36]. При проведении ВЭЖХ исследований ЛВ в плазме наиболее часто используемая НФ – силикагель с привитой С-18 фазой или С-8 фазой и размером частиц 5 мкм [3, 4, 7-9, 16, 18, 20, 25-27, 29-31, 36], реже применяются другие сорбенты – CN [19] и хиральные фазы [17]. В СВЭЖХ применяются в основном модифицированные С-18 [1, 2, 5, 6, 10-15, 21-24, 28, 33-35, 38] и С-8 [32] сорбенты, с размером от 1,5 до 3 мкм. Эти сорбенты могут содержать, в зависимости от фирмы производителя, различные включения, например, специальные химические мостики, позволяющие повысить механическую прочность НФ, а так же характеризуются большим рабочим диапазоном рН.

Температура, при которой происходит хроматографический процесс, оказывает влияние на эффективность, на стабильность времени удерживания веществ и на давление в хроматографической системе. Температура термостата колонок при ВЭЖХ исследованиях задается обычно на уровне 20-25 °С для поддержания постоянства условий анализа [3, 4, 7, 9, 17, 18, 25-27, 29-31, 36] или при более высоких значениях – 40-60 °С [16, 19, 20] для снижения вязкости ПФ и снижения рабочего давления в хроматографической системе. Повышение температуры, кроме снижения давления в системе позволяет добиться повышения эффективности разделения. При проведении СВЭЖХ исследований значение давления в системе может достигать 800 бар и более, однако желательно не допускать работы при повышенных значениях давления. Поэтому наиболее часто встречающаяся температура термостата колонок при проведении СВЭЖХ разделений выше комнатной – 40-50 °С, что позволяет понижать давление в системе до более низких значений [11, 22, 35, 38].

Скорость потока подвижной фазы важный параметр, влияющий на продолжительность анализа, эффективность разделения, расход подвижной фазы и давление в системе. В ВЭЖХ системах скорость потока ПФ, как правило, находится в диапазоне 0,8-1,5 мл в минуту, что позволяет проводить исследования с достаточной эффективностью, продолжительностью и давлением в системе. В некоторых случаях, для сокращения времени анализа увеличивают скорость хроматографирования до 2,5 мл в минуту [16, 19]. Высокая скорость потока в ВЭЖХ может негативно сказываться на чувствительности методики при применении масс-спектрометрии, так как может потребоваться

деление потока для снижения объема образующего в камере ионизации газа [31]. В случае с СВЭЖХ скорость подвижной фазы редко превышает 0,5 мл в минуту [21] и чаще всего находится в диапазоне 0,2-0,5 мл в минуту. Данный диапазон скорости потока ПФ позволяет проводить анализ за короткий промежуток времени, с достаточно высокой эффективностью разделения и при сравнительно небольших значениях давления. В случае СВЭЖХ необходимо отметить, что слишком маленькая скорость потока ПФ может приводить к размытию пробы при вводе её в хроматограф, что негативно сказывается на эффективности разделения.

Состав подвижной фазы в ВЭЖХ и СВЭЖХ подбирается исходя из хроматографического поведения исследуемых и сопутствующих веществ и из способа детектирования. Наиболее распространенный вариант хроматографии — обращеннофазовый, поэтому в ВЭЖХ и СВЭЖХ в качестве компонентов ПФ с высокой элюирующей способностью используются метанол и ацетонитрил. В качестве компонентов ПФ с меньшей элюирующей способностью используются водные растворы солей и кислот. В ВЭЖХ исследованиях это могут быть натриевые и калиевые соли фосфорной [4, 16, 25], уксусной [7, 9, 26] или трифторуксусной кислот, водные растворы муравьиной [8], трифтор- или трихлоруксусной кислот и др., а также ион-парные реагенты — натриевые соли гептансульфоновой кислоты, октансульфоновой кислоты и др [18, 29, 30, 36]. Существенным отличием СВЭЖХ от ВЭЖХ является необходимость применения из-за масс-детектирования только летучих компонентов. В результате для создания требуемой ионной силы используются соли аммиака - аммония ацетат [22] аммония трифторацетат [21] или растворы кислот — муравьиной [5, 10], трифторуксусной. Таким образом, при выборе ПФ в СВЭЖХ хроматографист оказывается в более сложных условиях по подбору состава ПФ, и возможна ситуация, когда не удастся подобрать подходящую ПФ. Из способов элюирования — изократического и градиентного, чаще применяется изократический способ. При этом с точки зрения аппаратного устройства в ВЭЖХ применяется элюирование с градиентом, как на стороне низкого давления, так и на стороне высокого давления, в то время как в СВЭЖХ оптимальным является градиентное элюирование на стороне высокого давления.

Объем вводимой в хроматографическую колонку пробы в случае анализа ЛВ в плазме обусловлен, как правило, низкой концентрацией исследуемого вещества, а так же способом детектирования, применяемого в той или иной

методике. Поэтому в ВЭЖХ исследованиях, где применяются все виды пробоподготовки, а наиболее частым методом детектирования является УФ-детектирование, реже ФЛД и масс-детектирование, объем вводимых в хроматограф проб находится в большом диапазоне — от 5 мкл до 75-100 мкл [20, 26, 36], что позволяет производить определение веществ с концентрациями на уровне 100-200 нг/мл. При вводе достаточно больших объемов пробы желательнее чтобы ее состав не оказывал значительного влияния на ПФ, что обычно достигается в случае ЖЭ и ТФЭ перерастворением пробы непосредственно в ПФ. В СВЭЖХ исследованиях применяются такие же способы пробоподготовки, как и в ВЭЖХ, однако наиболее распространенным способом детектирования является масс-спектрометрия, что позволяет проводить определение малых концентраций ЛВ при небольших объемах пробы. Самым распространенным объемом пробы в СВЭЖХ является объем 5 или 10 мкл [14, 24, 28]. С учетом объема колонки и скорости потока ПФ, данные объемы пробы являются достаточно большими и компоненты пробы могут оказывать существенное влияние на параметры разделения, поэтому в СВЭЖХ, как и в ВЭЖХ, прибегают к перерастворению пробы непосредственно в ПФ.

Время анализа одной пробы зависит от времени удерживания основного вещества и других компонентов исследуемой пробы, которые могут выходить со значительной задержкой, и накладываться на исследуемое вещество при недостаточном времени отмытки между анализами. Для СВЭЖХ характерно весьма малое время одного анализа — 2-3 минуты в изократическом режиме элюирования [12, 34], и 5-7 минут включая время регенерации в градиентном режиме элюирования [2, 22, 28, 32]. Для ВЭЖХ характерно большее время анализа, так только время выхода не удерживаемых компонентов может составлять 2,5-3 минуты. При проведении ВЭЖХ исследований наиболее распространенным временем одного анализа является 10-15 минут [4, 7, 9, 17], а при применении ион-парных реагентов в составе подвижной фазы время анализа может достигать 45 минут [30]. Таких же величин время анализа может достигать при применении градиентного элюирования, в результате необходимости времени на регенерацию колонки [26]. Сравнивая время анализа в ВЭЖХ (от 8 до 45 минут) и в СВЭЖХ (2-3 минуты), становится заметным главное преимущество последней — меньшее в разы время, затрачиваемое на одно исследование, что существенно в случае, когда нужно провести большое количество исследований, за возможно меньший период времени.

Детектирование

Наиболее часто встречающийся детектор при ВЭЖХ исследованиях является УФ-детектор с диодной матрицей, что позволяет проводить детектирование по времени удерживания и по спектру поглощения [3, 8, 9, 16, 18, 25, 26, 29, 36]. Реже используются флуориметрические [4, 19, 20, 30] и масс- детекторы [7, 17, 31]. Из масс-детекторов чаще всего используются квадрупольные детекторы [7], реже тройные квадрупольные детекторы [17, 31] и другие разновидности MS и MS/MS детекторов. В СВЭЖХ в виду малого времени одного исследования и при этом большой пиковой емкости к детектированию предъявляется требования большей чем в ВЭЖХ скорости сбора данных и, крайне желательна высокая специфичность. В результате самым распространенным способом детектирования в СВЭЖХ является масс-детектирование с тройным квадрупольным детектором, тандемным квадрупольно-времяпролетным детектором [10], а УФ-детектированию отводится второстепенная роль. В большинстве исследований детектирование производится с мониторингом множественных реакций (MRM), что позволяет увеличить селективность детектирования и чувствительность.

В таблицах 1 и 2 представлены данные о способе пробоподготовки, условиях хроматографирования и детектирования ЛВ, описанные в данной работе. Одной из основных моделей оборудования для ВЭЖХ и СВЭЖХ, на которых проводят опубликованные биоаналитические исследования, является приборы Agilent. Среди опубликованных статей в качестве станции ВЭЖХ используются модели Agilent Series 1200, для СВЭЖХ – Agilent Infinity 1290.

Выводы

ВЭЖХ и СВЭЖХ одинаково применимы для определения ЛВ в плазме и других биологических жидкостях. При проведении пробоподготовки для проведения исследования методом СВЭЖХ, как правило, требуется дополнительная стадия очистки перед вводом пробы в хроматограф – фильтрация или центрифугирование, что увеличивает время пробоподготовки в сравнении с исследованием методом ВЭЖХ. При проведении хроматографического разделения большой выбор по составу ПФ и типу НФ доступен при ВЭЖХ, чем при СВЭЖХ, однако в СВЭЖХ время исследования меньше в 5-10 раз, что позволяет проводить значительно большее количество исследований. Детектирование при ВЭЖХ исследовании может проводиться одно(двух)волновым УФ-детектором, диодной матрицей, флуориметрическим детектором, различными масс-детекторами, и поэтому исследователь располагает большим набором инструментов и может выбрать наиболее подходящий для конкретного анализа. В СВЭЖХ центральная роль в детектировании отводится тройному квадрупольному детектору, который позволяет проводить детектирование с высокой чувствительностью и селективностью, что дает возможность определять не доступные для УФ и флуориметрического детекторов концентрации ЛВ с низкой дозировкой, например гормонов. Таким образом, оба метода подходят для определения ЛВ в плазме и в совокупности позволяют определять широчайший спектр ЛВ.

ЛВ	Пробо- подготовка	Хар-ки колонки	Т, С	Скорость потока, мл/мин	Состав ПФ, режим элюирования*	Объем пробы, мкл	Способ детекти- рования	Время анализа, минут
Абакавир и микофеноловая кислота [20]	ЖЭ	C18, 100 x 4,6 мм, 3,5 мкм	40	1,5	25 мМ фосфатный буфер рН 7,8 - ацетонитрил; ИР	100	УФ и ФЛД	20
Аторвастатин [16]	ЖЭ	C18, 1 50 x 4,6 мм, 5 мкм	62	2,5	50 мМ фосфатный буфер рН 4,0 - метанол; ИР	20	УФ	6
Ацикловир и ганцикловир [30]	Осаждение с ТФУ	C18, 250 x 4,6 мм, 5 мкм	20	1	р-р гептансульфоната натрия, рН 2,6 – ацетонитрил; ГР	30	ФЛД	42
Дарунавир [25]	ТФЭ	C8, 250 x 3 мм, 5 мкм	20	0,6	вода – ацетонитрил; ИР	50	УФ	30
Зидовудин, ламивудин, невирапин [29]	ТФЭ	C8, 150 x 3,9 мм, 5 мкм	20	1	20 мМ фосфатный буфер с 8 мМ октансульфо-натом натрия рН 3,2 - ацетонитрил; ИР	20	УФ	20
Иматиниб [26]	ТФЭ	C18, 25 x 4 мм, 5 мкм	20	1	р-р ацетата аммиака – метанол; ГР	50	УФ	45
Индапамид [7]	ЖЭ	C18, 250 x 4,6 мм, 5 мкм	25	0,8	р-р ацетата аммиака – метанол; ИР	40	МС	10
Капецитабин, 5-ФУ [8]	ЖЭ	C18, 150 x 4,6 мм, 5 мкм	30	1,4	Р-р муравьиной к-ты – метанол – вода – вода; ГР	40	УФ	30
Мемантин [4]	ЖЭ, дериватиза- ция	C18, 250 x 4,6 мм, 5 мкм	20	1,8	25 мМ фосфатный буфер с н-бутиламинол – ацетонитрил; ИР	50	ФЛД	15
Метформин [36]	Осаждение ацетонит- рилом	C18, 150 x 4,6 мм, 4 мкм	20	1,5	10 мМ фосфатный буфер с 0,01% р-ром октансульфоната натрия рН 5,1 – ацетонитрил; ИР	100	УФ	6
Микофеноловая к-та [31]	Осаждение перхлорук- сусной к-той	C18, 150 x 4 мм, 5 мкм	20	1,3	20 мМ ацетат аммиака с муравьиной к-той рН 3,0 – метанол – ацетонитрил; ИР	5	МС/МС	4
Ондансетрон [3]	ЖЭ	C18, 100 x 4,6 мм, 10 мкм	20	1,5	20 мМ фосфатный буфер рН 3 – ацетонитрил; ИР	100	УФ	7
Рisperидон [17]	ЖЭ	Хиральная, 50 x 4,6 мм	20	1	10 мМ ацетат аммиака – этанол/пропанол – гексан; ГР	20	МС/МС	8,1
Ритонавир [18]	ЖЭ	C18, 75 x 4,6 мм, 3,5 мкм	20	1	25 мМ ацетат натрия с 25 мМ гексансульфононовой кислоты рН 4,0 – ацетонитрил; ИР	100	УФ	20
Темозоломид [9]	ЖЭ	C18, 150 x 4,6 мм, 5 мкм	20	1	р-р уксусной к-ты – ацетонитрил; ИР	20	УФ	10
Тенофовир [27]	ТФЭ	C18, 250 x 4,6 мм, 5 мкм	20	1, с градиентом в конце анализа	15 мМ фосфатный буфер с 10 мМ ТБА – ацетонитрил; ГР	150	УФ	25
Топирамат [19]	ЖЭ с дериватиза- цией	CN, 150 x 6 мм, 5 мкм	62	2	50 мМ фосфатный буфер с триэтиламинол рН 2,2 – ацетонитрил; ИР	20	ФЛД	7,2

* ИР – изократический режим элюирования; ГР – градиентный режим элюирования.

Таблица 1. Условия определения лекарственных веществ в плазме методом ВЭЖХ.

ЛВ	Пробо- подготовка	Хар-ки колонки	Т, С	Скорость потока, мл/мин	Состав ПФ, режим элюирования*	Объем пробы, мкл	Способ детекти- рования	Время анализа, минут
Буметанид [21]	ТФЭ	С18, 100 x 4,6 мм, 3 мкм	-	0,6	5 mM трифторацетат аммиака рН 6,0 – метанол; ИР	15	МС/МС	3,5
Вальпроевая к-та [22]	ТФЭ	С18, 50 x 2,1 мм, 1,7 мкм	50	0,5	10 mM ацетат аммиака – ацетонитрил; ГР	10	МС/МС	7
Венфлаксин [1]	ЖЭ	С18, 50 x 2,1 мм, 1,7 мкм	40	0,3	10 mM ацетат аммиака – метанол; ИР	10	МС/МС	3
Дабигатран [32]	Осаждение метанолом	С8, 100 x 1 мм, 1,7 мкм	40	0,18	р-р муравьиной кислоты – метанол; ГР	10	МС/МС	4,5
Дапномицин [10]	ЖЭ	С18, 100 x 2,1 мм, 1,7 мкм	40	0,3	р-р муравьиной кислоты – ацетонитрил; ГР	10	МС/МС	3,5
Дарунавир [5]	ЖЭ	С18, 50 x 2,1 мм, 1,7 мкм	40	0,3	р-р муравьиной кислоты – ацетонитрил-метанол; ГР	10	МС/МС	1,6
Дилтиазем [11]	ЖЭ	С18, 100 x 2,1 мм, 1,7 мкм	45	0,2	10 mM ацетат аммиака – ацетонитрил; ИР	10	МС/МС	2
Иматиниб [2]	ЖЭ	С18, 50 x 2,1 мм, 1,7 мкм	-	0,4	2 mM формиат аммиака рН 3,0 – ацетонитрил; ГР	7	МС/МС	5,5
Левосуль перидин [34]	Осаждение ацетонитри- лом	С18, 100 x 2,1 мм, 1,7 мкм	30	0,2	1 mM формиат аммиака рН 3,0 – ацетонитрил; ИР	5	МС/МС	3
Ловастатин [12]	ЖЭ	С18, 50 x 2,1 мм, 1,7 мкм	40	0,35	5 mM ацетат аммиака – ацетонитрил; ИР	10	МС/МС	1,7
Микофеноло вая к-та [31]	Осаждение метанолом	С18, 100 x 2,1 мм, 1,8 мкм	40	0,5	2 mM ацетат аммиака с муравьиной к-той – метанол; ИР	10	МС/МС	4
Митиглинид [6]	ЖЭ	С18, 50 x 2,1 мм, 1,7 мкм	40	0,25	10 mM ацетат аммиака – метанол; ИР	10	МС/МС	2,5
Палонсетрон [13]	ЖЭ	С18, 50 x 2,1 мм, 1,8 мкм	45	0,2	р-р муравьиной кислоты- метанол; ИР	10	МС/МС	1,2
Суматриптан, напроксен [28]	ТФЭ	С18, 50 x 2,1 мм, 1,7 мкм	30	0,25	4 mM ацетат аммиака – метанол – ацетонитрил; ИР	10	МС/МС	1,6
Тестостерон, дигидротесто- стерон [38]	ЖЭ, с дериватиза- цией	С18, 100 x 2,1 мм, 1,7 мкм	50	0,5	2 mM ацетат аммиака – ацетонитрил; ИР	5	МС/МС	5
Фенилэфрин [23]	ТФЭ	С18, 50 x 2,1 мм, 1,7 мкм	35	0,4	10 mM формиат аммиака рН 3,5 – ацетонитрил; ИР	7,5	МС/МС	2
Финастерид [14]	ЖЭ	С18, 50 x 2,1 мм, 1,7 мкм	25	0,2	1 mM формиат аммиака рН 3 – ацетонитрил; ИР	5	МС/МС	3,5
Флуктоциллин, ампициллин [35]	Осаждение ацетонитри- лом	С18, 50 x 2,1 мм, 1,7 мкм	40	0,2	10 mM формиат аммиака – ацетонитрил; ИР	2,5	МС/МС	3,5
Хлорпромазин [15]	ЖЭ	С18, 50 x 2,1 мм, 1,7 мкм	40	0,5	р-р муравьиной кислоты- ацетонитрил; ИР	5	МС/МС	2
Эпирубицин [24]	ТФЭ	С18, 50 x 1 мм, 1,7 мкм	30	0,2	р-р муравьиной кислоты- ацетонитрил; ИР	10	МС/МС	4

* ИР – изократический режим элюирования; ГР – градиентный режим элюирования.

Таблица 2. Условия определения лекарственных веществ в плазме методом СВЭЖХ.

Список литературы

1. F. Qin, N. Li, T. Qin et al., *Journal of Chromatography B*, 878, 689–694 (2010).
2. C. Arellano, P. Gandia, T. Lafont et al., *Journal of Chromatography B*, 907, 94–100 (2012).
3. M. Depot, S. Leroux, G. Caille, *Journal of Chromatography B*, 693, 399–406 (1997).
4. R. F. Suckow, M. F. Zhang, E. D. Collins et al., *Journal of Chromatography B*, 729, 217–224 (1999).
5. A. Gupta, P. Singhal, P. S. Shrivastav et al., *Journal of Chromatography B*, 879, 2443–2453 (2011).
6. S. Cai, T. Huo, W. Feng et al., *Journal of Chromatography B*, 868, 83–87 (2008).
7. L. Ding, L. Yang, F. Liu et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42, 213–217 (2006).
8. L. Zufia, A. Aldaz, J. Garildez, *Journal of Chromatography B*, 809, 51–58 (2004).
9. H. Kim, P. Likhari, D. Parker et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 461–468 (2001).
10. F. N. Bazotia, E. Gikasb, A. Skoutelisc et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 78–85 (2011).
11. B. Dasandi, S. Shah, Shivprakash, *Journal of Chromatography B*, 877, 791–798 (2009).
12. Dong Wang, Dongmei Wang, Feng Qin et al., *Biomedical Chromatography*, 22, 511–518 (2008).
13. Shuyan Yang, Feng Qin, Dan Wang et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 57, 13–18 (2012).
14. P. B. Phapale, H. W. Lee, M. Lim et al., *Journal of Chromatography B*, 878, 1718–1723 (2010).
15. N. C. Borges, V. M. Rezende, J. M. Santana et al., *Journal of Chromatography B*, 879, 3728–3734 (2011).
16. G. Bahrami, B. Mohammadi, S. Mirzaeei et al., *Journal of Chromatography B*, 826, 41–45 (2005).
17. B. Cabovska, S. L. Cox, A. A. Vinks, *Journal of Chromatography B*, 852, 497–504 (2007).
18. R. M.W. Hoetelmans, M. Essenberg, M. Profijt et al., *Journal of Chromatography B*, 705, 119–126 (1998).
19. Gh. Bahrami, Sh. Mirzaeei, A. Kiani, *Journal of Chromatography B*, 813, 175–180 (2004).
20. Rolf W. Sparidans, Richard M.W. Hoetelmans, Jos H. Beijnen, *Journal of Chromatography B*, 750, 155–161 (2001).
21. D. S. Patel, N. Sharma, M. C. Patel et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66, 365–370 (2012).
22. P. Proenca, J. M. Franco, C. Musta et al., *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 18, 320–324 (2011).
23. S. Feng, Q. Zhao, J. Jiang et al., *Journal of Chromatography B*, 915–916, 28–32 (2013).
24. Ruiping Li, Lili Dong, Junxiong Huang, *Analytica Chimica Acta*, 546, 167–173 (2005).
25. L. Goldwirt, S. Chhun, E. Rey et al., *Journal of Chromatography B*, 857, 327–331 (2007).
26. N. Widmer, A. Beguin, B. Rochat et al., *Journal of Chromatography B*, 803, 285–292 (2004).
27. S. Sentenac, C. Fernandez, A. Thuillier et al., *Journal of Chromatography B*, 793, 317–324 (2003).
28. D. P. Patel, P. Sharma, M. Sanyal et al., *Journal of Chromatography B*, 902, 122–131 (2012).
29. B. Fan, J. T. Stewart, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 903–908 (2002).
30. N. Perrottet, A. Beguin, P. Meylan et al., *Journal of Chromatography B*, 852, 420–429 (2007).
31. G. Brandhorst, F. Streit, S. Goetze et al., *Clinical Chemistry*, 52, No. 10, 1962–1964 (2006).
32. X. Delavenne, J. Moracchini, S. Laporte et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 58, 152–156 (2012).
33. X. Delavenne, L. Juthier, B. Pons et al., *Clinica Chimica Acta*, 412, 59–65 (2011).
34. P. B. Phapale, H. W. Lee, M. Lim et al., *Journal of Chromatography B*, 878, 2280–2285 (2010).
35. C. Huang, J. Gao, L. Miao, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 59, 157–161 (2012).
36. A. Zarghi, S.M. Foroutan, A. Shafaati et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 197–200 (2003).
37. Polson C, Sarkar P, Incledon B et al., *Journal of Chromatography B*, 785, 263–275 (2003).
38. H. Licea-Perez, S. Wang, M. E. Szapacs et al., *Steroids*, 73, 601–610 (2008).

Контакты: Agilent MAPs:
maps_agilent@agilent.com

Дополнительная информация:
<http://www.your-analytical-solution.com>

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2013
Published in USA, September 1, 2013
5991-2995RURU

