Таким образом, медикаментозное лечение с применением холеритиков и холекинетиков достоверно снижает количество больных со сладж-синдромом и, следовательно, улучшает моторику ЖП и ЖВП.

В подгруппах 4 группы («Иркутская» столовая МВ) при поступлении переднезадний размер печени так же, как и в предыдущих подгруппах, был достоверно ($p<0,01$) увеличен по сравнению со здоровыми (табл. 2). Печень усиленной эхогенности регистрировалась в 38,46-50,0% случаев. Толщина стенки ЖП была достоверно ($p<0,001$) по отношению к здоровым увеличена у всех больных этой группы, при этом в 16,66-30,76% случаев она была усиленной плотности. Перегибы ЖП наблюдались в подгруппе 4.4 в 23,07% случаев, а рефлюкс желчи – в 15,38%. Сладж найден был у всех больных в 33,33-38,46% случаев. После лечения размеры печени достоверно не изменились. Толщина стенки ЖП достоверно ($p<0,001$) уменьшилась во всех подгруппах 4 группы, причем в подгруппе 4.1 до размеров здоровых. Уменьшилось также количество больных, имеющих сладж-синдром. Итак, при лечении столовой МВ «Иркутская» также отмечается уменьшение сладж-синдрома.

Следовательно, лечение на курорте «Аршан» в сравнении с медикаментозным и приемом столовой воды «Иркутская» оказывает значительные положительные сдвиги на состояние желчевыделительной системы, а именно уменьшает воспалительные явления в стенке ЖП, элиминирует сладж-синдром. Возможно, это связано с улучшением физико-химических свойств желчи, холекинетическим эффектом и нормализующим действием на моторику ЖП и ЖВП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бедненко В.С., Нестеров М.А. и др. Результаты комплексной УЗ-диагностики патологии сердца и внутренних органов у лиц, проживающих на территории крайнего Севера. В сб.: Материалы I всероссийского конгресса «Профессия и здоровье». М.– 2003. – С.410-411.
2. Болезни печени и желчевыводящих путей: Руководство для врачей. Под ред. В.Т. Ивашкина. М. – 2002. – 416 с.
3. Галкин В.А. Современные методы своевременной диагностики, предупреждения развития и лечения хронического некалькулезного холецистита// Тер. архив. – 1992. – Т.64,№1. – С.131-135.
4. Галкин В.А. Современные методы диагностики дискинезий желчного пузыря и некалькулезного холецистита.//Тер. Архив.-2001. – № 58. – С. 37-38.
5. Ищенко Н.С. Роль УЗ-исследования в диспансеризации: Автореф. дис... канд. мед.наук. – М.. – 1990. – С.8-16.

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В МЕДИЦИНЕ. ЧАСТЬ 2

ФЕДОРОВА Г.А., КОЖАНОВА Л.А., АЗАРОВА И.Н.

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск, Россия, fgalina@mail.ru;

КОЖАНОВА Л.А., ***к.х.н., ведущий специалист, ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия, kozhanova@econova.nsk.ru;***

АЗАРОВА И.Н., ***к.х.н., ведущий специалист, ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия, azarova@econova.nsk.ru.***

АННОТАЦИЯ

Показаны преимущества использования микроколоночной жидкостной хроматографии для решения задач диагностики заболеваний, контроля качества биодобавок и анализа лекарственных средств с помощью базы данных.

Ключевые слова: ВЭЖХ, микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография, контроль качества лекарственных средств и биодобавок, анализ метаболитов в биологических жидкостях, база данных ВЭЖХ – УФ.

Контактные координаты КОЖАНОВОЙ Людмилы Алексеевны: Тел.: +7-(383)-330-95-57**,** +7-(383)-330-93-66, факс +7-383-330-83-21, электронная почта kozhanova@econova.nsk.ru**.**

ВВЕДЕНИЕ

В первой части статьи по применению микроколоночной жидкостной хроматографии в медицине были показаны пути решения сложных медицинских задач из области терапевтического лекарственного мониторинга и фармакокинетических исследований. На конкретных примерах было показано, что переход к микроколонке размером ∅ 2x75 мм позволяет не только значительно снизить стоимость расходных материалов (дорогостоящих сорбентов для колонок и элюентов), но и получить дополнительные преимущества [1]:

- уменьшить время анализа в 3 раза;
- уменьшить расход растворителей в 10-20 раз;
- повысить чувствительность анализа в 10-20 раз, что одновременно снижает требования к чистоте растворителей;
- уменьшить рабочее давление на колонке в 3 раза, что снижает требования к хроматографическому оборудованию.

Во второй части статьи рассматривается использование микроколоночной жидкостной хроматографии для целей диагностики заболеваний, контроля качества пищевых биодобавок, а также для анализа лекарственных средств с применением базы данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали микроколоночный жидкостный хроматограф «Милихром А-02» (ЗАО ИХ «ЭкоНова», Новосибирск, Россия) с колонками размером ∅ 2x75 мм, заполненными сорбентами Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel, Германия), ProntoSIL 120-5 C18 AQ (Bishoff, Германия).

Для приготовления элюентов и обработки проб использовали ацетонитрил 1 сорта (ACN), трифторуксусную кислоту (Sigma, США), перхлорат лития, квалификации не ниже «х.ч.», бидистиллированную воду.

В качестве стандартных (контрольных) веществ были использованы фармацевтические субстанции лекарственных веществ с содержанием основного вещества не ниже 98%.

Условия хроматографического определения веществ приведены в тексте или в подписях к рисункам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Диагностика заболеваний. Помимо лекарственных веществ (примеры применения были показаны в первой части статьи) с помощью микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в биологических жидкостях можно определять также и различные эндогенные компоненты, увеличение или уменьшение которых по сравнению с нормой может свидетельствовать о наличии наследственных заболеваний или других отклонений в здоровье.

Примером использования микроколоночной хроматографии для диагностики нарушений обмена веществ служит применение для этих целей разработанного нами метода определения сахаров в моче с помощью ВЭЖХ [2]. При гликозуриях различной природы происходит нарушение обмена определенных сахаров, накопление их в крови и выделение с мочой, где они и обнаруживаются с помощью химических методов. Аномальные образцы мочи содержат, как правило, не более трех сахаров, редко пять-шесть.

Сахара относятся к классу соединений, слабо поглощающих свет в УФ-области спектра. Однако такие вещества можно детектировать в виде УФ-поглощающих производных (дериватов), получаемых в результате специальных химических реакций. Определение в виде производного позволяет повысить чувствительность определения в 3-4 раза. Кроме того, в некоторых случаях удается существенно сдвинуть максимум поглощения в длинноволновую область УФ-спектра, где значительно меньше влияние матрицы и других мешающих компонентов пробы. Для дериватизации восстанавливающих сахаров часто используется такой реагент, как 2,4-динитрофенилгидразин.

Нами предложен метод количественного определения сахаров в моче, основанный на переводе сахаров в 2,4-динитрофенилгидразоны, разделении их на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02», с регистрацией поглощения на λ = 360 нм. Условия элюирования: колонка – Nucleosil 100-5 C18, ∅ 2x75 мм. Элюенты: А – 0,1% трифторуксусная кислота в воде; Б – 70% ACN. Градиент: 2200 мкл 16 – 27% Б, 200 мкл 27-100% Б, линейный, 600 мкл 100% Б. Скорость – 150 мкл/мин., температура - 35^{0}С. Объем пробы – 5 мкл.

Определяемые сахара и интервалы концентраций: лактоза - 0,1-2 мг/мл, галактоза - 0,025-0,5 мг/мл, глюкоза - 0,05-1 мг/мл, фруктоза - 0,125 -1,5 мг/мл, арабиноза - 0,0125-0,15 мг/мл, ксилоза - 0,025-0,15 мг/мл. Относительные стандартные отклонения для середины приведенных интервалов: 0,02-0,05.

Важным преимуществом данного метода является отсутствие сложной подготовки пробы, связанной с удалением из мочи мешающих веществ. Реализованный в методе многоволновой режим детектирования (длины волн 250, 340, 360 нм – базовая длина волны) позволяет с помощью спектральных отношений – отношений площадей пиков на разных длинах волн к площади пика на базовой длине волны - надежно отличать сахара от других компонентов мочи и продуктов реакции дериватизации.

На рис. 1 показаны примеры хроматографического разделения гидразонов сахаров для стандартов сахаров и типичного образца мочи.

Предлагаемый метод был использован для диагностики наследственных заболеваний и патологических состояний в Государственном Новосибирс-

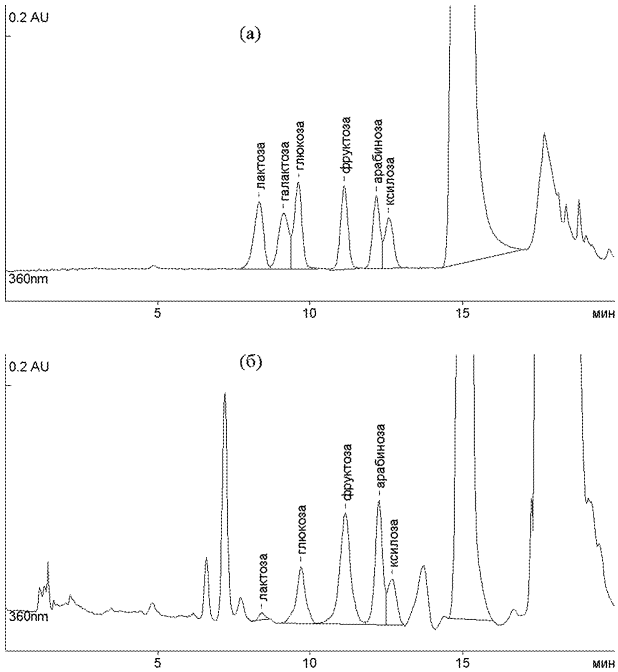

Рис 1. Хроматограммы гидразонов сахаров: (а) – для стандартов сахаров; (б) – для типичного образца мочи.

ком областном диагностическом центре. В 1999 г. с помощью данного метода было обследовано 80 пациентов, направленных медико-генетическим отделом областного диагностического центра. Выявлено 56 больных с повышенным содержанием различных сахаров: лактозы, галактозы, фруктозы, глюкозы, ксилозы, арабинозы.

Контроль качества пищевых добавок. Стандарты правильного питания в настоящее время немыслимы без использования в пищу различного рода пищевых добавок, БАДов, содержащих в своем составе витамины, антиоксиданты, другие полезные для организма биологически активные соединения. Многие из этих соединений могут быть либо крайне неустойчивыми, либо плохо совмещаться друг с другом в одной композиции. Поэтому очень важной представляется задача контроля соответствия заявленного состава БАДов реальному, содержания в них отдельных активных компонентов.

Важнейшими компонентами как БАДов, так и концентрированных поливитаминных препаратов (капсулированных или таблетированных фармакопейных препаратов, а также премиксов) являются водо- и жирорастворимые витамины – органические вещества сложной структуры, относящиеся к различным химическим классам, активирующие и поддерживающие основные биохимические реакции в организме. Известно, что многие витамины химически весьма неустойчивы. Это определяет важность задачи контроля витаминного состава различных форм витаминных препаратов в процессе производства, транспортировки, хранения.

Метод ВЭЖХ широко применяется для определения одного или нескольких витаминов в подобных объектах, однако задача оптимизации подготовки пробы к анализу и хроматографического разделения больших групп витаминов остается актуальной.

В работе [3] предложен оптимизированный вариант метода ВЭЖХ, позволяющий без сложной подготовки пробы определять витамины *B1, B2*, никотиновую кислоту, никотинамид, пантотеновую кислоту, фолиевую кислоту, витамины *B6, B12, K3*, *H*, *D2*, *D3* и ацетаты витаминов *A* и *E* в поливитаминных препаратах. Эта методика может быть использована для определения витаминов в любых фармакопейных препаратах – таблетках, капсулах, растворах. Относительные стандартные отклонения для большинства витаминов: 0,03-0,10.

Концентрированные поливитаминные препараты представляют собой сложные смеси витаминов, а также других органических и неорганических веществ-наполнителей различной природы. Иногда эти вещества и некоторые витамины не могут сосуществовать в растворе. Кроме того, для перевода в раствор каждого из витаминов необходимы свои, часто несовместимые с другими условия. Поэтому для улучшения результатов анализа необходимо для каждой смеси уточнять процедуру подготовки пробы (время, pH, температуру растворения и т.д.), учитывая конкретный состав пробы и определяемые в ней витамины. В работе [3] для водо- и жирорастворимых витаминов нами предложены свои универсальные варианты перевода витаминов в раствор с учетом усредненных литературных данных и собственных экспериментов. Что касается жирорастворимых витаминов, то нами было экспериментально показано, что для определения ацетатов витаминов *A* и *E* нет никакой необходимости проводить трудоемкую процедуру щелочного гидролиза.

Используя преимущества жидкостного хроматографа «Милихром А-02» – возможность одновременного многоволнового детектирования и гибкого подбора градиентного режима элюирования - нам удалось подобрать универсальные хроматографические условия для определения практически всех важнейших водо- и жирорастворимых витаминов за две хроматографические процедуры. При этом использование спектральных отношений для идентификации витаминов в дополнение к идентификации по временам удерживания позволяет отказаться от применения стандартов в каждой серии определений.

Условия хроматографического определения витаминов были следующие. Колонка ∅ 2x75 мм с Nucleosil 100-5 C18. Использовали градиентный режим элюирования для водо-растворимых витаминов. Элюенты: А-0,4 М $LiClO_4$ (pH 2,4); Б – ACN. Градиент: 8 мин 2% Б, 17 мин от 5 до 18% Б, линейный. Скорость потока – 100 мкл/мин., температура – 35^{0}C; объем пробы – 4-10 мкл. Детектирование на 6 длинах волн: 210, 220, 250, 260, 280, 300 нм. Базовые длины волн для построения градуировочных зависимостей витаминов были следующие: для *B6*, *H*, *ПК*, *HA* – 210 нм; *HK* – 250 нм; *B1* – 260 нм; *B2*, *Bc*, *K3* – 280 нм. Для жирорастворимых витаминов использовали изократический режим элюирования. Элюент: ацетонитрил : вода (95 : 5). Скорость потока – 100 мкл/ мин.; температура – 35^{0}C; объем пробы – 2-10 мкл. Детектирование на 6 длинах волн: 260, 270, 280, 290, 300, 320 нм. Базовые волн для построения градуировочных зависимостей витаминов следующие: *A*-ацетат, *E*-ацетат – 290 нм; *D2*, *D3* – 260 нм. Выбор базовых длин волн для некоторых витаминов, в частности, для *A*-ацетата, не совпадает с их максимумами поглощения, но обеспечивает единый диапазон измерений для всех витаминов.

На рис. 2 приведены хроматограммы фармакопейного поливитаминного препарата для мужчин «One a day» (Bayer, США) для водо- и жирорастворимых витаминов на трех длинах волн, выполненные по описанной методике.

Контроль качества лекарственных средств. Важнейшими показателями качества лекарственного средства (ЛС) являются содержание в нем основ-

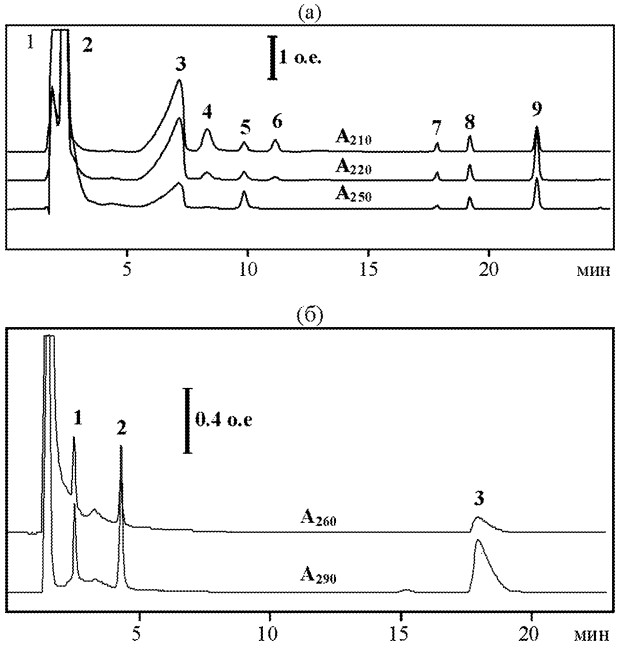

Рис. 2. Хроматограммы препарата «One a day»: (а) – для водорастворимых витаминов, пики витаминов: 3 – *HA*, 4 – *B6*, 5 – *B1*, 6 – *ПК*, 7 – *Bc*, 9 – *B2*; (б) – для жирорастворимых витаминов, пики витаминов: 2 – *A*-ацетат, 3 – *E*-ацетат.

ного вещества (веществ), а также присутствие вредных примесей не выше уровня, установленного требованиями нормативных документов. Основным методом, применяемым во всем мире для проверки этих показателей, является ВЭЖХ. В России развитие системы контроля качества ЛС как на предприятиях-изготовителях, так и на государственном уровне идет в направлении «гармонизации» с соответствующими системами ведущих стран. Однако прямое заимствование зарубежного опыта в решении задач контроля качества ЛС имеет ряд недостатков: фармацевтические статьи ориентированы на использование дорогостоящего оборудования, построены по принципу «для каждого вещества - своя методика анализа», перед каждым анализом необходима калибровка хроматографа по всем определяемым веществам.

В качестве альтернативы принципу «каждому веществу – своя методика анализа» авторы работы [4] предложили унифицированную методику анализа ЛС, реализуемую с помощью ВЭЖХ-анализатора. Такой ВЭЖХ-анализатор был разработан на основе микроколоночного жидкостного хроматографа «Милихром А-02».

ВЭЖХ-анализатор осуществляет автоматический анализ в градиентном режиме на колонке с обращенной фазой с одновременным детектированием на 8 длинах волн в диапазоне 210-300 нм. Анализатор снабжен компьютерной базой данных (БД), содержащей хроматографические и спектральные параметры веществ-аналитов. Идентификация хроматографических пиков проводится автоматически с помощью специализированной программы обработки МультиХром-СПЕКТР (ЗАО «Амперсенд», Москва) путем сравнения их объемов удерживания и спектральных отношений с параметрами, содержащимися в базе данных. Наличие БД позволяет идентифицировать компоненты анализируемого образца и определять их концентрацию в образце без обязательной предварительной калибровки хроматографа по определяемым веществам. В настоящее время БД включает порядка 500 веществ, и их количество постоянно увеличивается.

Стандартные условия хроматографического определения ЛС с помощью БД следующие. Колонка: ∅ 2x75 мм с обращенно-фазовым сорбентом С18. Элюенты: А – 0.2М $LiClO_4$ и 0.005М $HClO_4$ в воде; Б – ACN. Градиент: от 5 до 100% Б за 40 мин., линейный, 100% Б 3 мин. Скорость потока – 100 мкл/мин. Температура – 40°С. Детектирование: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм. Объем образца – 4 мкл [5]. Используемые элюенты стабильны во времени и не требуют ежедневного приготовления. Хроматографическая колонка в данных условиях эксплуатации выдерживает не менее 1000 анализов. Формирование БД осуществляется на калиброванном «эталонном» хроматографе «Милихром А-02» с применением стандартных образцов веществ согласно методике [6].

Для проверки пригодности ВЭЖХ-анализатора к работе с БД разработана процедура валидации, заключающаяся в хроматографировании в тех же «стандартных» условиях 5-компонентной тестовой смеси, где каждый компонент является «индикатором» определенных параметров хроматографической системы [5].

Предлагаемая методика идентификации и количественного определения ЛС по базе данных надежно работает не только с однокомпонентными образцами, но и с многокомпонентными ЛС. Пример хроматограммы одного из них – раствора таблетированного препарата «Седал М» (фармацевтические заводы Милве, Болгария) – показан на рис. 3.

Таким образом, анализ ЛС с использованием БД является весьма привлекательной альтернативой сложившейся традиции в ВЭЖХ-анализе ЛС и может стать основой создания единой общегосударственной системы контроля качества ЛС [7].

ВЫВОДЫ

Подводя итог, перечислим основные преимущества применения микроколоночного хроматографа с возможностями многоволнового детектирования и градиентного элюирования для решения медицинских задач:

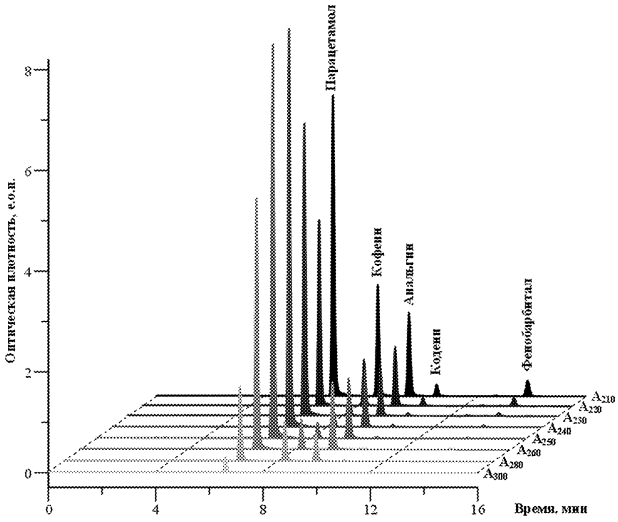

Рис. 3 . Хроматограмма водного раствора порошка таблеток «Седал М». Концентрации (мг/мл): парацетамол – 0,35; кофеин – 0,06; анальгин – 0,18; кодеин – 0,014; фенобарбитал – 0,02.

- высокая селективность разделения с использованием градиентного режима элюирования;
- надежная идентификация веществ с применением многоволнового детектирования;
- возможность идентификации и количественного определения ЛВ по базе данных без использования стандартных образцов;
- значительная экономия дорогостоящих расходных материалов;
- экспрессность анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baram G.I. Portable liquid chromatograph for mobile laboratories. I. Aims // J. Chromatogr. A. – 1996. – Vol. 728. – P. 387–399.

2. Куприянова Л.Я., Кожанова Л.А. Метод количественного определения сахаров в моче с помощью ВЭЖХ // Современные медицинские технологии: Сборник научных трудов. – Новосибирск. – 1999. – С. 292-295.

3. Кожанова Л.А., Федорова Г.А., Барам Г.И. Определение водо- и жирорастворимых витаминов в поливитаминных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журнал аналитической химии.- 2002.-Т. 57, №1.- С. 49-54.

4. Барам Г.И., Рейхарт Д.В., Гольдберг Е.Д., Изотов Б.Н., Родинко М.О., Хазанов В.А. Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармакопейном анализе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 135, № 1. – С. 75-79.

5. Массовая концентрация УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. № ФР.1.31.2003.00950.

6. Хроматографические и спектральные параметры УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. № ФР.1.31.2003.00951.

7. Барам Г.И., Гольдберг Е.Д., Рейхарт Д.В., Хабриев Р.У., Хазанов В.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в контроле качества лекарственных средств // Фарматека. – 2005. – № 2. – С. 12-15.