

Автоматические системы подготовки образцов к хроматомасс-спектрометрии для решения задач фармакологии и клинических исследований

■ **Л.В. Галактионова, к.х.н.**

Системное изучение лекарственного препарата путем оценки его эффективности и безопасности, выявления его клинических, фармакологических, фармакодинамических свойств, оценки всасывания, распределения, метаболизма, выведения и взаимодействия с другими лекарственными средствами в настоящее время невозможно без использования метода хроматомасс-спектрометрии. Подобное исследование включает в себя несколько основных стадий:

- подготовка пробы,
- разделение,
- детектирование.

Из них качество и повторяемость проведения предварительной подготовки образца является определяющим фактором, напрямую влияющим на воспроизводимость и достоверность получаемых на масс-спектрометре результатов. Это особенно актуально при анализе сложных многокомпонентных смесей, к которым относятся биологические жидкости.

Наиболее часто используемыми методами подготовки пробы к масс-спектрометрическому анализу являются:

- жидкость-жидкостная экстракция,
- осаждение белка,
- твердофазная экстракция (ТФЭ):
 - оффлайн-ТФЭ,
 - онлайн-ТФЭ.

Классические методы подготовки пробы, такие как жидкость-жидкостная экстракция и осаждение белка, являются наиболее трудоемкими, требуют значительного расхода растворителя, наличия дополнительных стадий и имеют ограниченную селективность.

В связи с этим все больший интерес пользователей приобретает метод твердофазной экстракции, как более специфичный, воспроизводимый и

удобный метод, обеспечивающий высокую степень извлечения требуемого соединения. При этом проведение процесса пробоподготовки методом ТФЭ в онлайн-режиме имеет ряд преимуществ по сравнению с оффлайн-ТФЭ, таких как:

- перенос аналита напрямую в аналитическую колонку без промежуточных стадий, что позволяет получать более высокие значения степеней извлечения;
- постоянство скорости потока растворителя и объема анализируемой пробы и, как следствие, высокая воспроизводимость анализа;
- возможность проведения процесса пробоподготовки с последующим МС-детектированием в полностью автоматическом режиме, что способствует сокращению времени проведения одного анализа и времени разработки нового метода.

В 2013 году компания «ЭЛЕМЕНТ» представила на российском рынке не имеющие аналогов в мире полностью автоматические онлайн-ТФЭ системы подготовки образцов к масс-спектрометрии производства компании Spark Holland (Нидерланды). Эти системы совместимы аппаратно и программно со всеми моделями жидкостных масс-спектрометров ведущих мировых производителей, таких как Shimadzu, ABSciex, Bruker, Waters, Perkin Elmer и др. Фирмой выпускаются как комплексные системы для ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС, объединяющие автоматическую систему онлайн-ТФЭ, ввода образца и ВЭЖХ, так и отдельные блоки: насосы, термостаты, autosamplers и т.д.

Отличительной особенностью систем пробоподготовки Spark Holland является реализованная концепция «подготовки образца под высоким давлением» (до 300 бар), а именно:

1. Специальная запатентованная конструкция ТФЭ-картриджей – «HySphere™», заполненных оптимальным по размеру частиц сорбентами <math>< 10 \text{ мкм}</math>. Компания Spark Holland разрабатывает и производит широкий круг сорбентов ТФЭ, гарантирующих высочайшую эффективность разделения и воспроизводимость анализа. На каждую партию картриджей ТФЭ (96 штук) поставляется сертификат о проведении анализа.

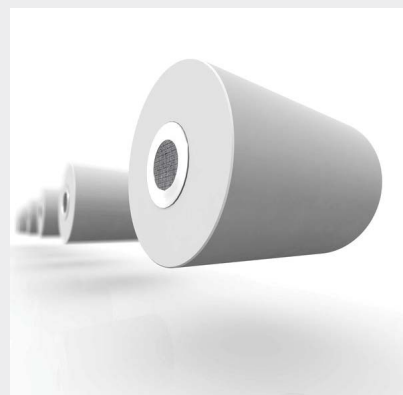


Рис. 1 Внешний вид картриджа ТФЭ «HySphere™»



Рис. 2 Бокс с картриджами ТФЭ, 96 шт.

При использовании картриджей ТФЭ «HySphere» малого размера достаточно совсем небольшого количества образца для достижения наивысшей чувствительности анализа. Отработанный картридж ТФЭ может быть регенерирован в соответствующем растворителе и использован повторно.

2. Функция постоянной скорости потока растворителя для всех образцов позволяет работать с образцами высокой плотности, а также с образцами, имеющими разную плотность.

Использование системы онлайн-ТФЭ сводит к минимуму количество ручных операций (не требуется проводить процедуру центрифугирования/фильтрации), исключает контакт оператора оборудования с анализируемым образцом, что полностью соответствует стандартам GLP. Кроме того, исключаются ошибки, связанные с работой оператора.

Процедура онлайн-ТФЭ происходит одновременно с масс-спектрометрическим анализом, таким образом, время, затрачиваемое на пробоподготовку, равно нулю.

В отличие от оффлайн-ТФЭ использование онлайн-систем Spark Holland позволяет снизить себестоимость выполнения одного анализа за счет малого расхода реагентов, а также отсутствия необходимости использовать дополнительную лабораторную посуду для хранения и сбора образца после проведения пробоподготовки.

Наиболее доступной и популярной является встраиваемая в ВЭЖХ-МС/МС система онлайн-ТФЭ Spark Holland, состоящая из двух основных блоков:



Автоматический высокоточный дозатор шприцевого типа для подачи реагентов (**HPD™ High Pressure Dispenser**):

- стандартная скорость подачи реагентов в диапазоне от 0.1 до 10 мл/мин. Диапазон дозируемых объемов:

0.1–1 мл с шагом 0.01 мл;

1–10 мл с шагом 0.1 мл;

10–100 мл с шагом 1 мл.

- работа при давлении до 30 МПа;
- возможность смешения двух растворителей в соотношении от 10% до 90%;
- рабочий диапазон pH: 1.0–12.5;
- модификация HPDTM-micro: обеспечивает скорость дозирования в диапазоне от 10 до 1000 мкл/мин;
- устройство выбора растворителя позволяет подавать до 24 растворителей с возможностью смешения в онлайн-режиме или до 24 реагентов для проведения онлайн-дериватизации.



Устройство для автоматической смены картриджей твердофазной экстракции (**ACE™ Automatic Cartridge Exchanger**), позволяет успешно работать в режимах онлайн, и, при необходимости, оффлайн-ТФЭ.

- вместимость: два лотка на 96 картриджей, способных выдерживать давление до 300 бар. Возможность установить дополнительный автоподатчик вместимостью до 10 лотков (960 картриджей) увеличивает производительность системы.
- устройство оборудовано роботизированным механизмом, способным захватывать ТФЭ-картридж с адсорбированными на нем аналитами и переносить в линию для десорбции компонентов в аналитическую колонку. При работе в параллельном режиме замена картриджа занимает не более 13 сек.
- Запатентованная технология TASPETM (Temperature Assisted Solid Phase Extraction): ТФЭ с контролем температуры дает дополнительные возможности по оптимизации процесса селективной очистки образцов.



Рис. 3 Пример сопряжения онлайн-системы твердофазной экстракции ACE™ + HPD™. Spark Holland с тройным квадрупольным жидкостным хроматомасс-спектрометром LCMS-8040 Shimadzu

Помимо этого компания Spark Holland предлагает комплексные онлайн-ТФЭ системы, предназначенные для решения задач фармакологии и клинических исследований:



Symbiosis™ Pico – универсальная интегрированная система ТФЭ-УВЭЖХ, позволяет проводить очистку, предварительное концентрирование и анализ неподготовленных образцов в полностью автоматизированном режиме.

Состав системы:

- Устройство для автоматической смены картриджей ТФЭ ACE Dual 2x ISS;
- Автоматический дозатор для подачи реагентов HPD mix 2x SSM;
- Автосемплер ALIAS™ с функцией охлаждения;
- Насос высокого давления SPH-1240 со встроенным миксером и 4-канальным вакуумным дегазатором;
- Емкости (органайзеры) для хранения бутылей с растворителем и картриджей ТФЭ;
- Программное обеспечение Analyst®.

Возможна комплектация системы термостатом Mistral™ (вместимостью до 6 колонок), снабженного клапаном переключения.



Symbiosis™ Pro – высокопроизводительная система ТФЭ-УВЭЖХ.

Symbiosis™ Pharma – уникальное решение для автоматического онлайн-ТФЭ-ВЭЖХ-МС-анализа, позволяющее вводить в систему «сырые» биологические образцы.

Состав системы:

- Устройство для автоматической смены картриджей ТФЭ ACE Dual 2x ISS;
- Автоматический дозатор для подачи реагентов HPD mix 2x SSM;

- Автосемплер Reliance (емкость автосемплера: 12 стандартных 96-луночных планшет или 24 планшеты с уменьшенным диаметром лунок; встроенная система охлаждения на элементах Пельтье;
- Емкости (органайзеры) для хранения бутылей с растворителем и картриджей ТФЭ;
- Программное обеспечение Analyst®

Примеры анализов, реализуемых на ВЭЖХ-МС/МС при помощи онлайн-ТФЭ-систем пробоподготовки Spark Holland:

1. Измерение содержания метанефрина в плазме с использованием автоматической онлайн-ТФЭ, совмещенной с ВЭЖХ и тандемным масс-спектрометром.
2. Автоматический МС- анализ катехоламинов в моче с использованием онлайн-ТФЭ.
3. Измерение содержания альдостерона в плазме методом полуавтоматической ВЭЖХ-МС/МС.

4. Совмещенный метод онлайн-ТФЭ, жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (XLC-MS) для определения тиронаминов в плазме крови и тканях и их превращение из 13С6-тироксина.

5. ВЭЖХ-МС/МС для исследования активности ренина в плазме с использованием ТФЭ.

6. Одновременное определение иммунодепрессантов методом онлайн-ТФЭ-ВЭЖХ-МС/МС: циклоспорина А, такролимуса, сиролимуса и зверолимуса.

7. Определение 5-гидроксииндолукусусной кислоты (5-НИАА) в моче с использованием автоматической совмещенной системы ТФЭ-ВЭЖХ-тандемный масс-спектрометр.

8. Определение несвязанного преднизолона, преднизона и кортизола в человеческой плазме и слюне методом ТФЭ-ВЭЖХ-МС/МС и потенциальная роль определения преднизолона и преднизона в слюне для целей лекарственного мониторинга.

Вы можете познакомиться с системами онлайн-ТФЭ производства Spark Holland в офисе компании «ЭЛЕМЕНТ» по адресу:

**117105 г. Москва, Варшавское ш., 1, стр. 6, БЦ «W Plaza 2»
тел./факс: (495) 514-00-48
e-mail: msc@element.utk.ru**

а также получить дополнительную информацию и консультации:

**620075, Екатеринбург, ул. Бажова, 68
тел./факс: (343) 278-34-64 (-65, -66, -67, -68, -69)
e-mail: element@element.utk.ru**

**630007, Новосибирск, ул. Октябрьская, 42, оф.225/3
тел./факс: (383) 20-20-726
e-mail: shim_ns@element.utk.ru**

Приглашаем также посетить наш стенд на предстоящих выставках:

**17-я специализированная выставка химической промышленности и науки «ХИМИЯ-2013» (28–31 октября 2013, Москва, ЦВК «Экспоцентр»)
Павильон №8, зал №1, стенд №81А15**

**Международная выставка «Pharmtech – Технологии фармацевтической индустрии».
(25–28 ноября 2013, Москва, ВВЦ).
Павильон 75А, стенд А 201**