

Хроматомасс-спектрометрия в фармакокинетических исследованиях

И.И. Мирошниченко¹, Ю.А. Федотов², Е.В. Горшкова¹, А.А. Иващенко²

¹ — Научный центр психического здоровья РАМН, г. Москва

² — Исследовательский Институт Химического Разнообразия (ИИХР), Московская область, г. Химки

В настоящее время в практике количественного определения содержания лекарственных веществ в биологических субстратах все большее применение находят так называемые «гибридные» методы. Под этим подразумевается сочетание масс-спектрометрии с хроматографическими методами разделения. В профессиональной среде существуют две совершенно разные точки зрения на эти гибриды. С точки зрения хроматографиста — масс-спектрометр, это не что иное, как детектор, пусть и более высокочувствительный и избирательный, чем обычный УФ-детектор. С другой стороны, для масс-спектрометриста хроматографическая система это не более, чем система ввода образца в спектрометр, наряду с прямым вводом в ионный источник. Истина, как обычно, лежит где-то посередине: масс-спектрометр обладает присущей ему селективностью по массе изучаемых соединений, тогда как хроматография позволяет в большей степени отделить изучаемые вещества от матрикса реальной биопробы.

Уже давно масс-спектрометр рассматривают как отличный детектор для газовой хроматографии. Как в газовом хроматографе, так и в масс-спектрометре определяемые вещества находятся в газовой фазе, что, несомненно, способствует соединению обеих приборных систем, а получаемые с помощью каждого из них аналитические данные просты для понимания и использования. Когда эти два прибора напрямую соединяют в единую хроматомасс-спектрометрическую систему (GC-

MS), возможности такой системы не просто равны сумме возможностей каждого прибора; аналитические возможности увеличиваются экспоненциально.

По той же причине, что и ВЭЖХ все больше вытесняет газовую хроматографию из фармацевтического анализа, так и в гибридных подходах сочетание жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS) становится преобладающим методом анализа биологических образцов. Дело в том, что LC-MS позволяет анализировать нелетучие и термонестабильные вещества. Вопросы количественного определения лекарственных веществ методом ВЭЖХ достаточно хорошо освещены в отечественных изданиях [2, 5]. В то же время, масс-спектрометрия является сравнительно новым инструментальным методом, и систематического изложения ее применения в фармацевтике и, в частности, в фармакокинетике в русскоязычных изданиях нет. Это обстоятельство и побудило нас к написанию этой статьи.

Рассмотрим блок-схему, общую для всех масс-спектрометров (рис. 1). Основным узел масс-спектрометра — масс-анализатор, где под действием электрического и магнитного поля происходит процесс разделения пучка ионов на фракции с одинаковым отношением массы к заряду (m/z). Поскольку анализировать можно только заряженные пучки, а в большинстве случаев нужно исследовать нейтральные частицы, необходимо



Рис. 1. Принципиальная схема LC-MS. В качестве метода ионизации здесь подразумевается химическая ионизация при атмосферном давлении

превратить последние в ионы. Для этого служит ионный источник, в котором нейтральные частицы подвергаются ионизации. Существует большое количество методов ионизации, на которых остановимся подробно в дальнейшем. Наконец, третья обязательная деталь — регистрирующее устройство, с помощью которого можно определить количество ионов с данным m/z .

Для ионизации нейтральных молекул наиболее часто используется метод электронного удара, который сопровождается деструкцией молекулы с образованием осколков (фрагментов). Подобный подход часто является неприемлемым для исследования органических молекул. Прогрессу в исследовании нелетучих и разлагающихся при нагревании веществ, обладающих, в частности, биологической активностью, способствовало в немалой мере разработка таких «мягких» методов ионизации, то есть ионизации без значительной фрагментации, как электрораспыление (Electrospray Ionization, ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI).

ESI происходит при взаимодействии сильного электростатического поля (прикладывается напряжение примерно 3–5 кВ) с поверхностью жидкости на конце капиллярной трубки. В исследуемой жидкости должны быть ионы. Поэтому обычно добавляют небольшие количества ионных солей или другие соединения, которые могут привести к образованию ионов. Жидкость, в качестве которой может быть элюент из хроматографической колонки, под воздействием поля распыляется с образованием мелких заряженных капель. Лучшей ионизации способствует добавление в подвижную фазу ВЭЖХ небольшое количество муравьиной кислоты (~ 0,1%). Процесс распыления происходит при атмосферном давлении и усиливается при добавлении газа в ионизационную камеру, как правило, азота высокой чистоты (99,999 %). Азот способствует испарению растворителя из капель. Капли уменьшаются, плотность поверхностного заряда увеличивается, что приводит к образованию капель меньшего размера. В конечном счете, происходит выделение ионов из ионных кластеров, которые через маленькое отверстие поступают в масс-анализатор.

Как упоминалось выше, ESI относится к мягким методам ионизации. В качестве фрагментов исследуемой молекулы образуются протонированный или депротонированный ионы, наличие которых характеризует соответственно положительную и отрицательную моды масс-спектрографии. Вообще говоря, отрицательная мода менее чувствительна, за исключением тех случаев, когда проходит образование стабильных анионов, к примеру, карбоксильных групп.

Важно отметить, что при ESI образуются многозарядные ионы, что позволяет расширить диапазон определяемых масс. В большинстве ионизационных процедур в отношении массы к заряду (m/z), величина $z=1$. Однако при использовании ESI значение z может быть очень большим, особенно для белков. В то же время для низкомолекулярных соединений (масса менее 1000 Да), к числу которых относится большое количество лекарственных веществ, значение z равняется 1 и при ESI.

Альтернативой электрораспылению служит APCI. Характерной чертой этого метода является то обстоятельство, что ионизация происходит вне вакуумной системы масс-спектрометра, а анализируемые вещества в потоке газа носителя (азот, аргон) поступают в анализатор через специальный интерфейс (рис. 1). В качестве источника ионов используют коронный разряд в положительной или отрицательной моде. APCI используют для количественного определения гораздо менее полярных соединений, чем при использовании ESI.

Масса определяемых веществ при APCI не превосходит 1500 Да. Этот способ ионизации позволяет применять обычные для ВЭЖХ величины расхода подвижной фазы порядка 1–2 мл/мин. Главным преимуществом APCI является незначительная, по сравнению с ESI ионная супрессия [16]. К недостаткам метода следует отнести трудность определения термонеустойчивых веществ. К тому же APCI может приводить к непредвиденной фрагментации образца.

При изучении высокомолекулярных соединений применяются и другие многообещающие источники ионизации: APCI/APPI — фотоионизация при атмосферном давлении / химическая ионизация, MALDI — лазерная десорбционная ионизация, облегчаемая матрицей, Nanospray — электрораспыление для работы с микрообразцами и нанолитровыми потоками жидкости, как в статическом, так и в динамическом режимах.

Ионизация анализируемых веществ при помощи фотонов ультрафиолетового света известна достаточно продолжительное время. В последнее время разработан новый многообещающий метод APPI. Механизм APPI заключается в абсорбции протона и испускания электрона нейтральной молекулой, что приводит к ее ионизации. Процесс нечувствителен к наличию других молекул, поэтому возможность ионной супрессии становится незначительной.

Метод MALDI обусловлен воздействием лазерного излучения, которое фокусируется на образец в смеси с соответствующей матрицей. При этом становится возможным изучение высокомолекулярных белков и синтетических полимеров [4].

К числу наиболее важных элементов фармакокинетических исследований следует отнести определение содержания микроколичеств исследуемых препаратов в биологических жидкостях. К сожалению, при использовании LC-MS наблюдается нежелательный феномен ионной супрессии, выражающийся в подавлении хроматографического отклика исследуемого соединения в реальной обработанной биопробе по сравнению с сигналом, полученным при детектировании стандартного образца в чистом растворителе. Возможно компоненты, содержащиеся в матриксе при ESI, вступают в конкурентную борьбу с молекулами определяемого вещества на поверхности заряженных капель, тем самым, снижая степень ионизации последних [18].

Приготовление подвижной фазы для LC-MS имеет свои специфические черты, связанные с детекцией. Дело в том, что кроме общих для традиционной ВЭЖХ проблем, связанных с интерференцией сывороточных пиков, для масс-спектрометров наблюдается феномен значительного уменьшения величины хроматографического сигнала вследствие ионизации самой подвижной фазы. Это явление получило название ионной супрессии. В связи с этим, не используются многие широко распространенные подвижные фазы, в частности категорически противопоказано использование неорганических буферов. Компоненты фосфатных и других неорганических буферов нелетучие, вследствие этого они накапливаются в ионном источнике и препятствуют ионизации исследуемых соединений. Фактическим стандартом для LC-MS являются градиентные смеси буфера ацетата аммония или муравьиной кислоты с органически модификатором (ацетонитрилом или метанолом).

Следует отметить и нежелательность использования при ESI из-за супрессии такого летучего компонента подвижной ВЭЖХ фазы, как трифторуксусной кислоты (ТФУ). Установлено, что добавление ТФУ приводит к уменьшению сигнала при детекции оснований в 10 раз по сравнению с уксусной кислотой. Это происходит вследствие образования стойкой ионной пары между анионом ТФУ и депротонированным катионом основания [8].

Сердце масс-спектрометра — анализатор ионов. В нем происходит разделение ионов, образующихся в ионном источнике. Рассмотрим основные типы анализаторов, находящихся свое применение в технологии LC-MS.

В квадрупольном масс-спектрометре (Q) разделение по массе достигается следующим образом. Между четырьмя параллельными стержнями (квадрупольными) создается высокочастотное электрическое поле. На них попарно подается по-

стоянное U и переменное радиочастотное $V\cos(t)$ напряжение.

Когда пучок ионов попадает в это поле, только ионы с определенным отношением масса/заряд имеют стабильную траекторию и попадают на детектор (коллектор). Нерезонансные ионы, получившие большую амплитуду, нейтрализуются на электродах. Детектирование пучков с различным отношением масса/заряд (развертку масс-спектра) проводят варьированием параметров электрического поля. Квадрупольные анализаторы и по сей день являются наиболее распространенными в фармацевтической практике. Они обеспечивают высокую скорость записи масс-спектров (скорость сканирования достигает 5000 Да/с), просты по конструкции, компактны и дешевы (разумеется, относительно других типов анализаторов). К недостаткам квадрупольных следует отнести недостаточно высокое разрешение (1000-2000) и невысокую точность измерения массы соединения (0,1-0,2 Да). Впрочем, эти ограничения в значительной мере преодолены в tandemном варианте.

Другим подходом к увеличению эффективности разделения стало применение (первоначально в GC/MS) квадрупольных анализаторов с ионной ловушкой (QIT). Принцип ионной ловушки заключается в достаточно длительном нахождении ионов в пространстве между двумя концевыми электродами и внутри кольцевого O-образного электрода. Удерживание ионов с заданными характеристиками обеспечивается приложением высокочастотного напряжения к кольцевому электроду. Ловушка может одновременно функционировать как источник ионов, камера для ионно-молекулярных реакций и анализатор масс.

Квадрупольные анализаторы имеют два основных режима регистрации масс: мониторинг одного выбранного иона (single ion monitoring, SIM) и сканирование диапазона масс. В режиме SIM параметры квадрупольного поля устанавливаются для измерения ионов определенной массы, что обеспечивает более высокую чувствительность и селективность для выбранных соединений или их фрагментов. При сканировании регистрируются все ионы, находящиеся в заданном интервале, к примеру от 200 до 400 Да.

В последние десятилетия широкое применение нашли времяпролетные масс-спектрометры и приборы ион-циклотронного резонанса. Во времяпролетном масс-спектрометре (английское сокращение — TOF от Time of Flight) пучок ионов, пройдя ускоряющую разность потенциалов (несколько киловольт), летит в бесполевого пространстве вакуумной трубы к детектору. Под действием одинакового ускоряющего напряжения, ионы с разным m/z приобретают разную скорость и регистрируются в разное время.

Строго говоря, время пролета ионов обратно пропорционально корню квадратному отношению массы к заряду.

Времяпролетные масс-спектрометры работают в импульсном режиме, длительность импульса для достоверной регистрации двух последовательных масс должна быть менее 10^{-4} с. Время сканирования полных масс-спектров составляет миллисекунды. Точность измерения массы соединения достигает значений порядка 5 ppm. Применение TOF целесообразно при исследовании процессов быстро протекающих во времени. В лучших приборных образцах диапазон измеряемых масс и разрешающая способность достигают нескольких тысяч, что в сочетании с методом ионизации MALDI делает их незаменимым средством измерения содержания макромолекул.

Масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FT-ICR) является одним из наиболее быстро развивающихся методов анализа биологических и лекарственных веществ благодаря высокой точности измерения масс, высокой разрешающей способности и чувствительности прибора. Анализаторы этого типа представляют собой ловушку ионов, образуемую шестью электродами, которые помещены в высокий вакуум и однородное магнитное поле. Использование сверхпроводящих магнитов, создающих сильные магнитные поля, позволяет получить высокие аналитические характеристики масс-спектрометров ICR, так как большинство фундаментальных параметров, свойственных данному типу анализаторов, возрастают с увеличением магнитной индукции [27]. Впрочем, для малогабаритных масс-спектрометров ICR используют недорогие постоянные магниты [21]. FT-ICR обладают высокой разрешающей способностью и чувствительностью определения исследуемых продуктов. Широкому их распространению не способствует высокая цена приборов укомплектованных таким типом анализатора.

Рассмотрим вкратце, третью, обязательную составляющую масс-спектрометра — регистрирующее устройство, с помощью которого можно определить количество ионов с данным m/z . Наиболее распространенными в настоящее время являются 3 типа детекторов: электронный умножитель, фотоумножитель и микроканальная плата. Первые два используются с квадрупольными в различной конфигурации, тогда как микроканальная плата сочетается с TOF.

Перейдем к рассмотрению так называемых мультигибридных систем, когда в системе задействовано несколько анализаторов. Широкое распространение получил метод тандемной масс-спектрометрии, основанный на использовании активации столкновением. Наиболее распростра-

нены приборы с тремя последовательными квадрупольными (конфигурация Q-Q-Q), где средний служит камерой столкновения (рис. 2).

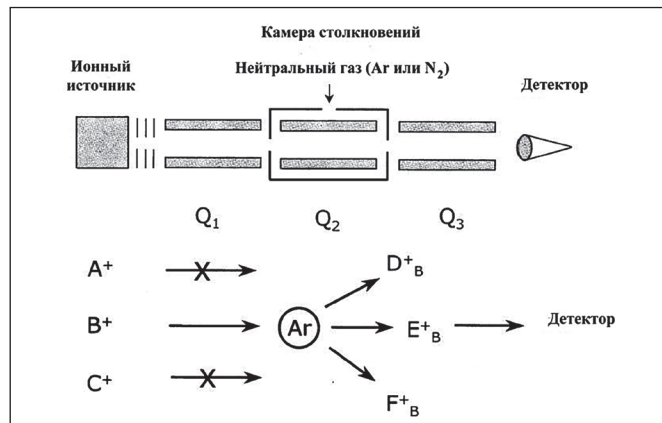


Рис. 2. Принципиальная схема трехквadrupольного MS/MS анализатора

Камера столкновений расположена в бесполом пространстве масс-спектрометра. Ионы, отфильтрованные первым анализатором (называемые материнскими ионами), попадают в камеру столкновений, где вследствие индуцированной столкновениями диссоциации (Collision Induced Dissociation — CID) они распадаются на фрагменты (называемые дочерними ионами). Массовый состав полученных фрагментов исследуется с помощью второго анализатора. Камера столкновений служит как бы вторым источником ионов, где происходит распад ионов, выделенных первым анализатором. Таким образом, в одном приборе оказываются соединенными два «источника ионов» и два анализатора. Это и дало название методу — «тандемная масс-спектрометрия» или «MS/MS» [1].

Возможны несколько режимов работы: сканирование всех дочерних ионов, образующихся из конкретного материнского иона; спектр всех материнских ионов, распадающихся с образованием конкретного дочернего иона и ряд других.

Остановимся на одном из них, который применяется в количественном анализе лекарственных веществ. Первый анализатор настроен на пропускание ионов с одним фиксированным значением m/z . Второй анализатор фиксирует количество прошедших ионов либо по одному (SIM), либо по нескольким каналам с заданным(и) значением(ями) m/z фрагментов. Такой режим мы в русском варианте называем режимом детектирования заданных масс (английский эквивалент Multi Reaction Monitoring — MRM). Режим MRM обеспечивает высокую эффективность в отсекании фона, и как следствие, значительно улучшает предел обнаружения.

Соединение в одну систему жидкостного хроматографа и масс-спектрометра представляет собой нетривиальную задачу. Эффективные величины потока в жидкостной хроматографии значительно выше, чем в газовой. Для поддержания вакуума в ионном источнике необходимо удаление подвижной фазы, поступающей в источник со скоростью 0,5-2 мл/мин, что эквивалентно расходу газа порядка 100-200 мл/мин. В прошлом для этой цели применяли устройства типа ленточного транспортера или использовали прямой вкол. Для уменьшения количества растворителя свое применение находит хорошо известный в капиллярной газовой хроматографии метод расщепления потока.

В настоящее время для LC/MS наиболее часто используются методы основанные на электро- и термораспылении, рассмотренные ранее. Широкую популярность приобрело ортогональное расположение источника распыления по отношению к анализатору. С точки зрения удаления растворителя подобный подход предпочтителен линейного расположения, представленного на рис.1. Дальнейшее развитие эта стратегия получила в разработке Micromass: так называемый «Z-spray» ESI источник, в котором поток молекул анализируемого вещества и элюента дважды изменяет направление под прямым углом.

Рассмотрим приложения LC/MS в биоаналитических, в частности, в фармакокинетических исследованиях. Как можно уяснить из вышеизложенного, хроматомасс-спектрометр является, чуть ли не идеальным средством детекции лекарственных средств в биологических субстратах. При этом достигается как селективность, так и универсальность определения [23]. Исходя из этого, LC-MS применяется практически во всех областях, где проводятся фармакокинетические исследования, как на стадии разработки новых оригинальных средств, так и на стадии дальнейшего изучения и повышения эффективности применения апробированных лекарственных средств. Все же, на наш взгляд, следует выделить две области, где использование LC-MS наиболее целесообразно: высокопроизводительный фармакокинетический скрининг (ВПФС) и изучение метаболизма лекарственных веществ.

В настоящее время мы являемся свидетелями настоящего прорыва в области поиска новых потенциально активных лекарственных средств. На смену традиционному интуитивному поиску и тривиальному скринингу приходит компьютерный прогноз и комбинаторная химия. Это приводит к тому, что изучение фармакологических свойств новых веществ отстает по скорости от их синтеза.

К сожалению, вещество-кандидат (ВК) с хорошей активностью *in vitro* не всегда проявляет

активность *in vivo*, в случае, если вещество не обладает достаточной биодоступностью и приемлемой длительностью действия. Множество потенциально активных веществ приходится выбраковывать из-за нежелательных ФК характеристик, таких как слишком большой или, напротив, слишком короткий период полувыведения, плохое всасывание из ЖКТ или же интенсивный метаболизм при первичном прохождении через печень. В обзоре *Prentis et al.* [25] указано, что из 319 ВК при исследовании в 1 и 2 фазе 40% были отбракованы из-за серьезных ФК проблем. Поиск новых ЛС включает в себя 2 этапа: создание (design) и внедрение (development). Очевидно, что изучение фармакокинетических свойств ВК необходимо начинать на стадии синтеза с целью вовремя откорректировать нежелательные ФК свойства и разработать приемлемый лекарственный дизайн [12, 14, 29, 30].

ВПФС представляет собой сочетание хроматомасс-спектрометрии и автоматизированных систем пробоподготовки. LC-MS — разделение происходит в градиентном режиме на коротких (2-5 см) колонках. Тандемная масс-спектрометрия в этом случае позволяет разделить ко-элюирующие пики (т.е. пики веществ разной массы, время хроматографического удерживания которых одинаково). Использование коротких колонок позволяет достичь разделения многокомпонентных смесей в течение нескольких минут, что является настоящим прорывом по сравнению с 50 минутными градиентами в обычной ВЭЖХ-практике для колонок длиной в 25 см.

Автоматизированная пробоподготовка включает в себя как жидкофазную, так и твердофазную экстракцию. В простейшем случае можно ограничиться осаждением сывороточных белков. Роботизированные планшеты с 96 лунками стали достаточно распространенным устройством для обработки проб перед инструментальным анализом [24]. Кроме того, используются методы очистки образцов *on-line* в ВЭЖХ системе с переключением колонок или с использованием монолитных колонок.

При ВПФС целесообразна разработка экспресс методик, пусть даже с некоторым ущербом для их валидности. Такие показатели, как сходимость и воспроизводимость метода, могут быть опущены. В то же время стабильность образцов и предел чувствительности определения (LOQ) необходимо установить. Ну и, конечно, необходимо позаботиться о наборе контрольных образцов.

На рис. 3 представлен пример анализа содержания в плазме крови крыс потенциального лекарственного вещества с помощью ультрафиолетовой (УФ) и МС детекции. Существенно, что невысокая чувствительность определения концентрации вещества при УФ детекторе, приводит к недо-

пустимому искажению значений таких важных для ВПФС параметров, как период полувыведения и AUC: $T_{1/2}=1,63$ ч, $AUC=648$ нг/мл*ч — при УФ детекции ($LOQ = 100$ нг/мл); $T_{1/2}=4,53$ ч, $AUC=1091$ нг/мл*ч — при МС детекции ($LOQ=10$ нг/мл).

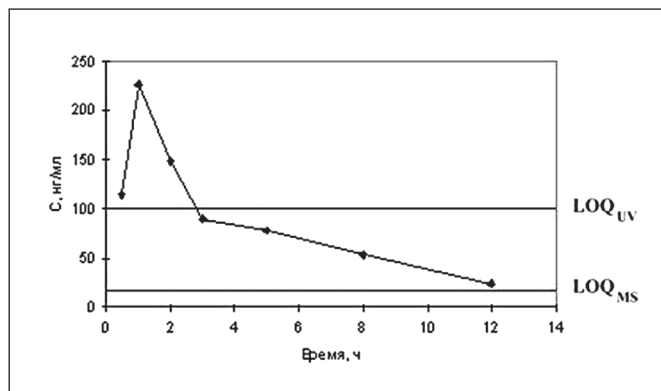


Рис. 3. Влияние чувствительности метода на значение ФК параметров

С точки зрения организации проведения исследования для увеличения производительности ВПФС применяются такие подходы как кассетный пул образцов и временной пул [18].

Кассетный пул: несколько ВК, как правило, одного гомологического ряда, вводятся одному животному одновременно (в одном флаконе). Одно из этих веществ должно быть проанализировано заранее при стандартном введении.

Образцы, отобранные через разные промежутки времени после введения ВК объединяются в единый пул, который и анализируется. Считается, что подобным методом можно косвенно оценить значение AUC (для определения относительной биодоступности).

Применение LC-MS позволяет определять продукты метаболизма лекарственных веществ в низких концентрациях, и, что существенно, идентифицировать предполагаемые метаболиты, исходя из их молекулярной массы. Последнее обстоятельство позволяет избежать, по крайней мере на ранних стадиях лекарственного дизайна, дорогостоящего синтеза потенциальных метаболитов.

Продукты биотрансформации лекарственных веществ в отношении их фармакологической активности могут быть классифицированы следующим образом:

- активные, которые могут отличаться от исходного вещества в фармакокинетическом (различия в значениях клиренса и объема распределения по сравнению с исходным препаратом) или же фармакодинамическом аспекте (разные механизмы действия, вплоть до антагонизма с исходным препаратом). Отсюда следует, что

эффективность и безопасность при применении лекарственных средств, имеющих активные метаболиты, зависят не только от фармакокинетики собственно исходного средства, но и от фармакокинетики их активных метаболитов;

- токсические, что по определению нежелательно;
- неактивные, концепция лекарственного дизайна «soft drug» предусматривает разработку фармакологически активного средств, которое подвергается предсказуемому метаболизму с образованием неактивных и нетоксичных продуктов распада;
- обратимые, которые могут в дальнейшем подвергаться метаболическим превращениям и приобретать различные свойства, как положительные, так и отрицательные.

Метаболизм ВК исследуется до клиники *in vitro*, в основном на микросомальных фракциях у человека и *in vivo* методами масс-спектрометрии и ЯМР в плазме крови и моче животных. Следует отметить, что ферментный спектр у человека и животных очень различается. В связи с этим на ранних стадиях разработки лекарственных средств опыты *in vivo* на животных могут быть менее информативными, чем эксперименты *in vitro* на модельных системах, различающихся по степени селективности с одной стороны, и интегративности с другой:

- экспрессные ферментативные системы;
- микросомы;
- гепатоциты;
- срезы тканей.

Изучение метаболизма даёт информацию о лекарственном взаимодействии, об изоформах ферментов, вовлеченных в процессы биотрансформации. Методы изучения метаболических превращений *in vitro* позволяют получить ответ на следующие вопросы [20]:

- Является ли исследуемое вещество мощным ингибитором или же наоборот индуктором ферментов, катализирующих метаболизм сопутствующих препаратов?
- Какова скорость метаболических превращений?
- Какие специфические ферментативные системы ответственны за метаболизм данного вещества?

И, наконец, последняя по порядку, но, пожалуй, наиболее значимая информация — идентификация метаболитов.

Влияние исследуемого вещества на систему ферментов цитохрома P450 (CYP) оценивают путем измерения концентрации специфичного для данного семейства ферментов субстрата и его метаболита на модели микросом *in vitro*. В качестве

ве маркерных субстратов используют фенацетин, кумарин, толбутамид, S-мефенитоин, буфуралол, хлорзоксазон и нифедипин, которые селективно подвергаются метаболизму посредством изоформ P450: CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 или CYP3A4, соответственно [17].

При изучении метаболизма гиперфорина, одного из главных компонентов экстракта зверобоя, в модельной системе микросомальных фракций, методом LC-MS обнаружено четыре главных метаболита. Структура этих окисленных по метильным группам производных была установлена [9].

Приведем пример из собственной практики определения деалкилированных и окисленных метаболитов противовирусного средства арбидола *in vitro*.

Состав среды инкубации.

Взвесь микросом в концентрации 20 мг/мл в фосфатном буфере, содержащем 1,3 mM ко-фактора NADP⁺, 66 mM MgCl₂, 66 mM глюкозы 6-фосфата, и 50 мкл 40 Units/мл глюкозы 6-фосфата дегидрогеназы. Реакцию запускали добавлением 40 мкл раствора арбидола в концентрации 1 мг/мл, инкубировали при 37⁰ C в течение 60 минут и останавливали путем погружения в ледяную воду.

Условия разделения.

Подвижная фаза градиент 90→10% вода/ацетонитрил с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты. Разделение проводилось на колонке Zorbax 300 SB-C18 (3,5 мкм, 2,1 x 100 мм) при скорости течения элюента 400 мкл/мин.

Условия детекции:

Прибор API 2000.

Ионизация — электрораспыление.

Анализатор — трехквадрупольный MS/MS.

Режим —MRM.

В то время как для изучения I фазы метаболизма лекарственных средств *in vitro* наиболее распространенная модель — микросомы, для обнаружения конъюгатов (фаза II метаболизма), как правило, используются гепатоциты [11].

На стадии внедрения лекарственного средства и его постклинического изучения используются методы определения метаболитов *in vivo* в моче и плазме крови человека.

Обнаруженные в моче метаболиты агониста имидазолиновых рецепторов моксонидина (*m/z* 241): M1(*m/z* 240), M5 (*m/z* 258) и M6 (*m/z* 327), были соответственно идентифицированы в положительной моде ионизации как дегидромоксонидин, метоксимоксонидин и конъюгат моксонидина с цистеином [10].

Заканчивая обсуждения методов изучения метаболизма посредством масс-спектрометрии, невозможно не коснуться феномена «перекрестных помех» («cross-talk», по терминологии англоязычных авторов) [7]. Взаимное искажение масс-спектрометрического отклика происходит в камере столкновения квадрупольного анализатора, когда от разных по массе ионов-предшественников образуются одинаковые по массе фрагменты. При этом в режиме выбранного иона SIM ионы от предыдущего мониторинга могут находиться в камере столкновений. Этот эффект зависит от скорости отклика детектора и в современных генерациях приборов в значительной мере преодолен. При изучении метаболизма необходимо принимать во внимание и другой источник cross-talk — в источнике ионизации, когда N-окисленные и глюкуронированные метаболиты при ионизации теряют фрагменты массой в 16 и 176 Да, соответственно, что приводит к образованию иона, аналогичному ионизированному исходному веществу.

В клинической фармакокинетике главным преимуществом LC-MS по сравнению с традиционными методами жидкостной и газовой хроматографии является более высокая чувствительность количественного определения концентрации лекарственных веществ. В работе [6] приводится методика определения содержания, как материнских ионов, так и фрагментов карбамазепина, фенитоина, атенолола, ацебутолола, пиндолола и пропранолола. В отличие от ВЭЖХ разделение изучаемых компонентов было полным. Предел обнаружения (LOD) находился в пределах 0,2-0,5 мкг (ВЭЖХ) и 10-25 нг (LC-MS). Применение tandemной масс-спектрометрии позволило вести терапевтический лекарственный мониторинг скополамина при кожных аппликациях: диапазон концентраций составлял 56-245 пикограмм/мл [26].

В настоящее время методики хроматомасс-спектрометрического определения следовых количеств лекарственных веществ в биологических субстратах разработаны для большого количества препаратов. Приведем ряд примеров использования LC-MS для измерения концентрации лекарственных веществ: противоопухолевых средств [28], сердечных гликозидов [19], антидепрессантов [19], карбапенемовых антибиотиков [15], азитромицина [3], сертралина [13]. Список этот, разумеется, может быть продолжен: смотри хотя бы обзор [22].

Масс-спектрометрия является мощным оружием идентификации и количественного определения органических соединений. Это приводит к некоему пренебрежению к выработке оптимальных условий хроматографического разделения

и/или пробообработки. На самом деле, ионная супрессия, cross-talk и матричная интерференция значительно снижаются при адекватно разработанной методике ВЭЖХ. Попытки использовать

тандемную масс-спектрометрию для определения содержания препарата в биопробах без сочленения с хроматографической системой ни к чему хорошему не привели [18].

Литература

1. Зашкин В.Г., Варламов А.В., Микая А.И., Простаков Н.С. Основы масс-спектрометрии органических соединений. // М.: МАИК «Наука/Интерпериодика, 2001. — 286 С.
2. Мирошниченко И.И., Тюлев И.И., Зуев А.П. Биодоступность лекарственных средств. // М: Грамотей — 2003.- 112С.
3. Писарев В.В., Смирнова Л.Б., Москалева Н.Е. и др. Определение азитромицина в плазме крови методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. // Клини. Фармакокин. — 2004. — №1. — С.23-26.
4. Сидоров Л.Н. Масс-спектрометрия и определение массы больших молекул. // Соросовский Образовательный Ж., — 2000. — Т. 6, №11, . — С.41-45.
5. Шатиц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. — Рига: Зинатне, 1988. — 392 С.
6. Abdel-Hamid M.E. Comparative LC-MS and HPLC analyses of selected antiepileptics and beta-blocking drugs. // Farmaco. — 2000. — Vol.55.,No.,2. — P.136-145.
7. Ackermann B.L., Berna M.J., Murphy A.T. Recent advances in use of LC/MS/MS for quantitative high-throughput bioanalytical support of drug discovery. // Curr. Top. Med. Chem. — 2002. — Vol.2.,No.1. — P.53-66.
8. Apffel A., Fischer S., Goldberg G. et al. Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. // J.Chromatogr. A. — 1995. — Vol.712., No.1. — P.177-190.
9. Cui Ya., Ang C.Y.W., Beger R.B. et al. In vitro metabolism of hyperforin in rat liver microsomal systems. // Drug Metabol. Dispos. — 2004. — Vol.32., No.1. — P.28—34.
10. He M.M., Abraham T.L., Lindsay T.J. et al. Metabolism and disposition of the antihypertensive agent moxonidine in humans. // Drug Metabol. Dispos. — 2003. — Vol. 31, No. 3. — P.334—342.
11. Hewitt N.J., Uhring K.-U.B., Dasenbrock J. et al. Studies comparing in vivo:in vitro metabolism of three pharmaceutical compounds in rat, dog, monkey, and human using cryopreserved hepatocytes, microsomes, and collagen gel immobilized hepatocyte cultures // Drug Metabol. Dispos. — 2001. — Vol. 29, No. 7. — P.1042—1050.
12. Hopfgartner G., Bourgonne E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. // Mass Spectrom. Rev. — 2003. — Vol.22.,No.3. — P.195-214.
13. Jain D.S., Sanyal M., Subbaiah G. et al. Rapid and sensitive method for the determination of sertraline in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. — 2005.- Vol.829.,No.1-2. — P.69-74.
14. Kariv I., Rourick R.A., Kassel D.B., Chung T.D. Improvement of «hit-to-lead» optimization by integration of in vitro HTS experimental models for early determination of pharmacokinetic properties. // Comb. Chem. High Throughput Screen. — 2002. — Vol.5.,No.6. — P.459-472.
15. Koal T., Deters M., Resch K., Kaever V. Quantification of the carbapenem antibiotic ertapenem in human plasma by a validated liquid chromatography-mass spectrometry method. // Clin. Chim. Acta. — 2006. — Vol.364.,No.1-2. — P.239-245.
16. Liang H. R., Foltz R. L., Meng M., Bennett P. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 2003 — Vol.17., No.24. — P.2815-2821.
17. Lieu C., Shi J., Donat F., Van Horn R., et al. Fondaparinux sodium is not metabolised in mammalian liver fractions and does not inhibit cytochrome P450-mediated metabolism of concomitant drugs. // Clin. Pharmacokinet. — 2002. — Vol.41.,Suppl.2. — P.19-26.
18. Lim C.-K., Lord G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. // Biol. Pharm. Bull. — 2002.- Vol.25.,No.5. — P.547-557.
19. Marquet P. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. // Ther. Drug Monit. — 2002. — Vol.24.,No.2. — P.255-276.
20. Masimirembwa C.M., Thompson R., Andersson T.B. In vitro high throughput screening of compounds for favorable metabolic properties in drug discovery. // Comb. Chem. High Throughput Screen. — 2001. — Vol.4.,No.3. — P.245-263.
21. Mauclaire G., Lemaire J., Boissel P. et al. MICRA: a compact permanent magnet Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. // Eur. J. Mass Spectrom.- 2004. — Vol.10.,No.2. — P.155-162.
22. Maurer H.H. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. // Clin. Biochem. — 2005. — Vol 38. — P.310—318.
23. Muck W. Quantitative analysis of pharmacokinetic study samples by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). // Pharmazie — 1999. — Vol.54.,No.9. — P.639-644.
24. O'Connor D. Automated sample preparation and LC-MS for high-throughput ADME quantification. // Curr. Opin. Drug Discov. Devel. — 2002. — Vol.5.,No.1. — P.52-58.
25. Prentis R.A., Lis Y., Walker S.R. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). // Br. J. Clin. Pharmacol. — 1988. — Vol.25.,No.3. — P.387-396.
26. Renner U.D., Oertel R., Kirch W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine. // Ther. Drug Monit 2005. — 2005. — Vol.27., No.5. — P.655-665.
27. Senko M.W., Canterbury J.D., Guan S., Marshall A.G. A high-performance modular data system for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 1996. — Vol.10., No.14. P.1839-1844.
28. Stokvis E., Rosing H., Beijnen J.H. Liquid chromatography-mass spectrometry for the quantitative bioanalysis of anticancer drugs. // Mass Spectrom. Rev. — 2005. — Vol.24.,No.6. — P.887-917.
29. Tiller P.R., Romanyszyn L.A., Neue U.D Fast LC/MS in the analysis of small molecules. // Anal. Bioanal. Chem. — 2003. — Vol.377.,No.5. — P.788-802.
30. Timmerman P.M., de Vries R., Ingelse B.A. Tailoring bioanalysis for PK studies supporting drug discovery. // Curr. Top Med. Chem. — 2001. — Vol.1.,No.5. — P.443-462.