

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-1-52-57
© Коллектив авторов, 2019

*Д. А. Абаимов**, *Л. Р. Спавронская*, *А. А. Шабалина*,
М. М. Танащян, *А. К. Сариев*

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ САЛИЦИЛАТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ, ПРИНИМАЮЩИХ АСПИРИН В КАЧЕСТВЕ АНТИАГРЕГАНТНОЙ ТЕРАПИИ

ФГБНУ "Научный центр неврологии", Россия, 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80;
e-mail: abaidenis@gmail.com

Разработан и метрологически валидирован хроматомасс-спектрометрический метод количественного определения салициловой и ацетилсалициловой кислот в плазме крови человека. Созданным методом измерено содержание салициловой и ацетилсалициловой кислот в образцах плазмы крови 26 пациентов с цереброваскулярными заболеваниями (ЦВЗ), постоянно принимающих аспирин в дозе 75 – 100 мг в сутки в качестве антиагрегантной терапии с целью первичной, либо вторичной профилактики сосудистых событий. Показано, что пациенты, в чьих пробах определяется ацетилсалициловая кислота, демонстрируют более выраженный фармакологический ответ на антиагрегантную терапию.

Ключевые слова: фармакорезистентность; салицилаты; аспирин; антиагреганты; лекарственный мониторинг; масс-спектрометрия; газовая хроматография; дериватизация.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных изучению резистентности к аспирину, в настоящее время не разработаны клинические рекомендации по коррекции антиагрегантной терапии на основании анализов агрегационных характеристик тромбоцитов или других показателей, и не существует стандартизированной методики, позволяющей прогнозировать эффективность аспирина [1]. Согласно Меморандуму рабочей группы по изучению резистентности к ацетилсалициловой кислоте Международного общества по тромбозу и гемостазу, она может быть обусловлена снижением биодоступности препарата. Данную резистентность можно охарактеризовать как фармакокинетическую резистентность [2]. По имеющимся литературным данным в основе неэффективности препаратов аспирина чаще всего лежит фармакокинетический механизм, связанный как с замедлением всасывания, так и с уменьшением биодоступности, что диктует необходимость контроля сывороточной концентрации препарата в крови [3]. К сожалению, существующие способы количественного анализа ацетилсалициловой и салициловых кислот в плазме крови в большинстве случаев были разработаны для определения содержания указанных соединений при назначении аспирина в больших дозах (в качестве НПВС), причем для анализа салицилатов применялся малоизбирательный спектрофотометрический способ детек-

тирования, что, как правило, отрицательным образом сказывается на селективности методики, делая весьма вероятными интерференции аналитов с коэкстрактивными веществами биологического происхождения [4, 5]. По этой причине нижний предел количественного определения вышеназванных методов не соответствует задачам определения салицилатов при введении их в низких, антиагрегантных дозах (100 мг и ниже). В этой связи нами была поставлена цель создания собственного метода терапевтического лекарственного мониторинга салицилатов для преодоления фармакокинетической резистентности к аспиринотерапии цереброваскулярных заболеваний (ЦВЗ), для решения которой были поставлены следующие задачи: 1) разработать, оптимизировать и валидировать газохроматографический метод одновременного количественного анализа салициловой и ацетилсалициловой кислот в плазме крови с масс-спектрометрическим детектированием; 2) измерить созданным методом содержание салицилатов в плазме крови больных, принимающих аспирин в качестве антиагрегантной терапии; 3) оценить степень корреляции между концентрационными значениями салицилатов в крови и интенсивностью их фармакологического эффекта на реологические свойства крови.

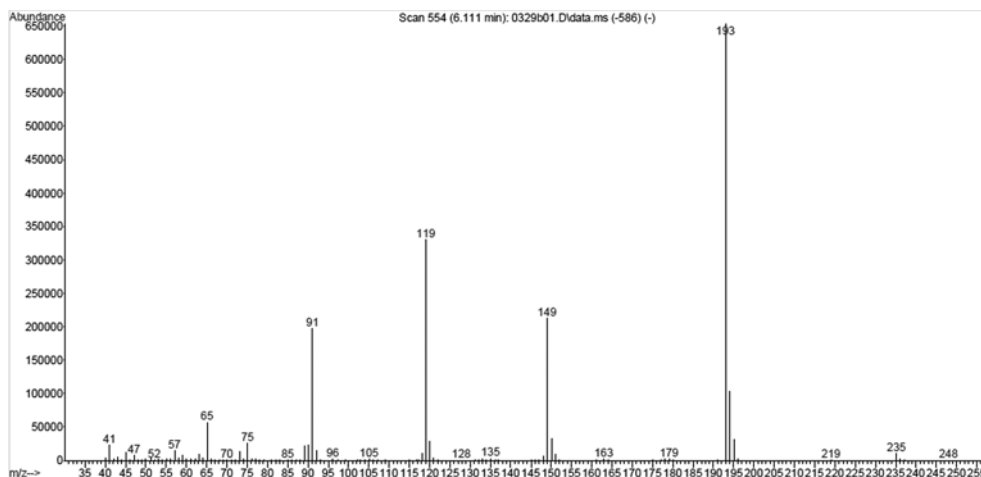


Рис. 1. Масс-спектр TBDMS-производного пара-толуиловой кислоты (*трет*-бутилдиметилсилиловый эфир толуиловой кислоты, TBDMS-производное).

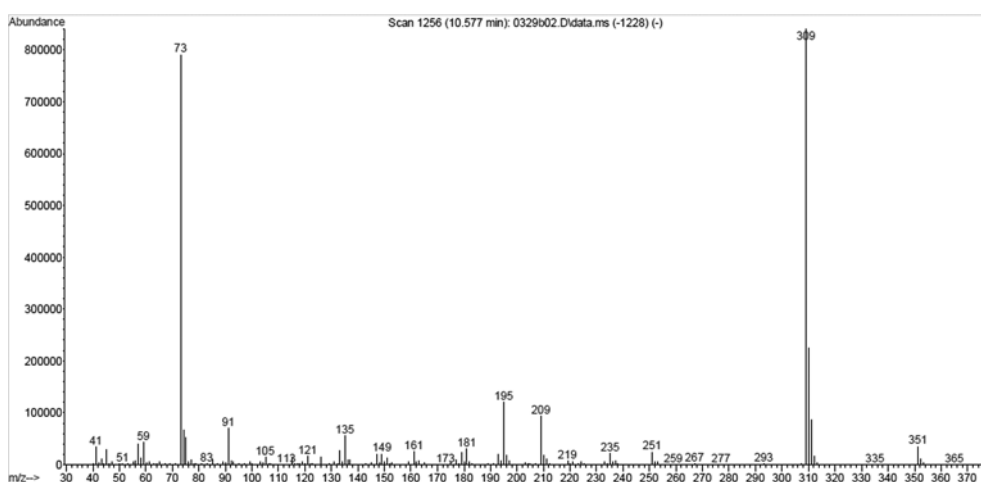


Рис. 2. Масс-спектр 2TBDMS-производного салициловой кислоты (*трет*-бутилдиметилсилиловый эфир салициловой кислоты).

Экспериментальная часть

У 26 пациентов с ЦВЗ, постоянно принимающих препараты АСК с целью первичной либо вторичной профилактики сосудистых событий, был проведен анализ фармакокинетики ацетилсалициловой кислоты и салициловой кислоты и оценка остаточной реактивности тромбоцитов. Забор проб производился на концентрационном максимуме, который соответствует 2 ч после приёма препарата (согласно литературным данным) и на максимуме антиагрегационного фармакологического эффекта (6 ч после приёма препарата). Пробоотбор производился в гепаринизированные вакуумные пробирки. Необходимый минимальный объем крови для анализа — 4 мл. Пробирки с кровью центрифугируют в гематологической охлаждаемой центрифуге при температуре +4 °С на скорости 3500 об/мин для получения плазмы крови. Плазму крови переносят в гематологические криопробирки с завинчивающейся крышкой объемом 2 мл. В пробирки с целью ингибирования ферментативного гидролиза салицилатов добавляли 20 мкл пересыщенного раствора фторида калия. На пробирку с образцом плазмы крови наносят индивидуальный цифровой код пациен-

та, а также информацию о дате и времени сбора образца. Далее образцы замораживают с помощью жидкого азота и помещают в низкотемпературный морозильник, где хранят при температуре не выше –70 °С до дня анализа. Допустимость хранения в условиях глубокой заморозки подтверждается рядом литературных источников, описывающих поведение аспирина в тесте стабильности при замораживании и оттаивании [6–8]. В день анализа размороженные образцы плазмы крови подвергают центрифугированию на скорости 13000 об/мин для осаждения примесей и фрагментов форменных элементов крови. Анализ АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (АДФ-АТ) проводили методом световой трансмиссионной агрегометрии. Критерием эффективности антиагрегантной терапии при длительном (постоянном) приеме АСК считалось снижение АДФ-АТ до 40 % и более (норма АДФ-АТ 40–46 %). Такие пациенты (N = 13) с АДФ-АТ 40 % и ниже были отнесены к чувствительным к терапии — “респондеры”. Пациенты с АДФ-АТ в пределах 41–50 % (N = 9) отнесены к “относительно чувствительным”. Пациенты с АДФ-АТ от 51 % и выше были отнесены к группе нечувствительных к те-

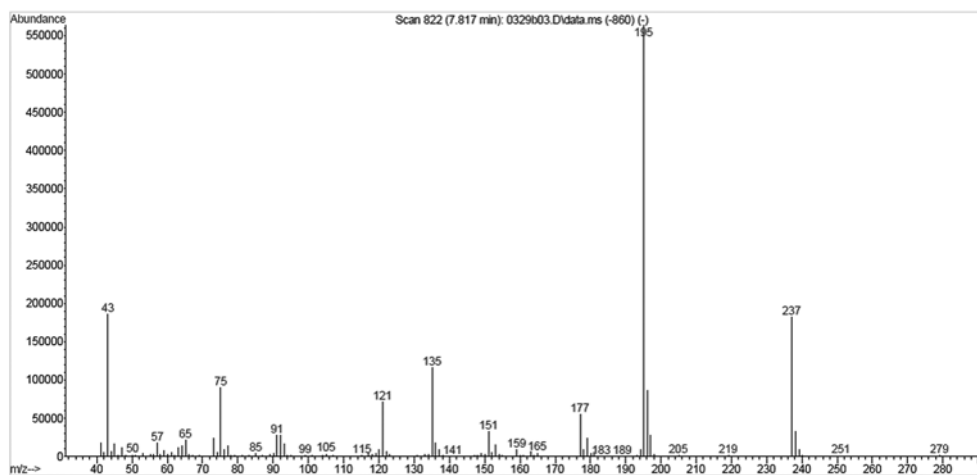


Рис. 3. Масс-спектр TBDMS-производного ацетилсалициловой кислоты (*трет*-бутилдиметилсилиловый эфир ацетилсалициловой кислоты).

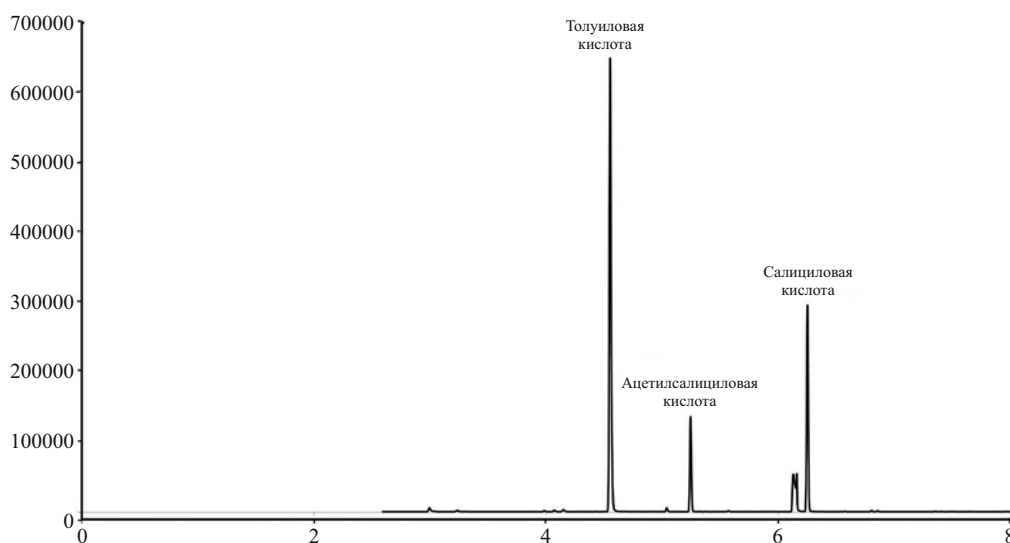


Рис. 4. Масс-хроматограмма TBDMS-производных салицилатов с внутренним стандартом — толуиловой кислотой. По оси абсцисс — время хроматографирования, мин, по оси ординат — ионный ток, условные единицы интегрирования. Пик с временем удерживания 6,1 — TBDMS-производное ортофосфорной кислоты.

рации — “нереспондеров”. Измерение АДФ-АТ проводили на максимуме антиагрегационного фармакологического эффекта, который согласно литературным и эмпирическим данным нашей лаборатории составляет 6 ч после приёма препарата [9]. Использовали следующие реактивы и органические растворители (о.с.ч.): ортофосфорную кислоту; деионизированную воду с сопротивлением 18 МОм; диэтиловый эфир; хроматографические стандарты ацетилсалициловой, салициловой и *n*-толуиловой кислот (Sigma-Aldrich). В качестве газа-носителя использовали гелий (99,9999 %). Анализ проб проводили на газовом хромато-масс-спектрометре Agilent 5975/6850 (США). Для хроматографирования применяли капиллярную колонку HP-1 фирмы Agilent Technologies (США) с неполярной привитой неподвижной фазой (100 % диметилполисилоксан), диаметр 0,32 мм, длина 30 м, толщина привитой фазы 0,25 мкм. В качестве вспомогательного оборудо-

вания при пробоподготовке использовали вибротриксер “Vortex”, центрифужный концентратор Eppendorf Concentrator 5301 и др. Образцы крови для подбора условий хроматографирования ацетилсалициловой и салициловой кислот отбирались в объеме 5 – 7 мл, пробы центрифугировали для отделения плазмы при 3000 об/мин в течение 10 мин и хранили до анализа при температуре – 70 °С. Для статистических расчётов использовали специализированную программу Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

Существует целый ряд биоаналитических методов, позволяющих определять ацетилсалициловую и салициловую кислоты в различных биологических матрицах. Наиболее распространенным подходом является применение классической жидкостной хроматографии

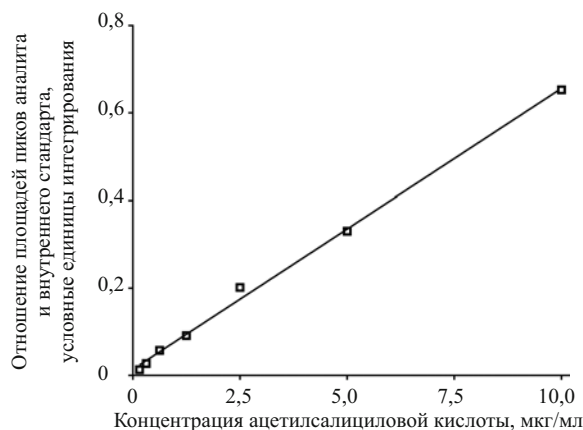
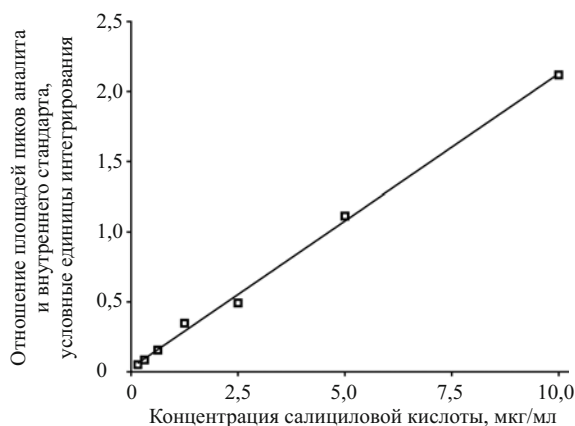


Рис. 5. Калибровочные кривые для салицилатов в плазме крови.

со спектрофотометрическим детектированием, но этот метод имеет ряд серьезных ограничений, главными из которых являются низкая избирательность, слабая чувствительность и интерференция целевых соединений с коэкстрактивными веществами. Большую эффективность и надёжность обеспечивает метод жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрии с применением особого типа ионизации — высокотемпературного туробоионного электроспрея (TIS), который, однако, не получил широкого распространения ввиду высокой стоимости данного типа масс-спектрометров [10]. Ввиду этого в области анализа салицилатов наиболее востребованным является метод газовой хроматомасс-спектрометрии с дериватизацией, который сочетает высокую чувствительность, избирательность и относительно умеренную стоимость приборной базы. В литературе описан также целый ряд методов дериватизации салицилатов и прочих НПВС с применением в качестве дериватизирующего агента *N*-(*трет*-бутилдиметилсилил)-*N*-метилтрифторацетамида (MTBSTFA), однако эти методы, к сожалению, до настоящего времени не адаптированы под конкретные задачи количественного анализа ацетилсалициловой и салициловой кислот в плазме крови человека [11 – 13]. В этой связи нами была поставлена цель создания собственного количественного метода масс-спектрометрического определения салицилатов в плазме крови с применением MTBSTFA в качестве силилирующего агента. На основании анализа литературных данных для извлечения целевых соединений был выбран следующий метод жидкостной экстракции. Подготовку плазмы крови осуществляли методом жидкостно-жидкостной экстракции. В пластиковую пробирку типа “Эппендорф” объемом 2 мл отбирали 250 мкл плазмы, добавляли 25 мкл стандартного раствора внутреннего стандарта (толуиловой кислоты) с концентрацией 100 мкг/мл, затем перемешивали на аппарате для встряхивания жидкости 5 с, добавляли 250 мкл 20 % ортофосфорной кислоты и 1 мл диэтилового эфира. Далее пробирку встряхивали на вортекс-миксере в течение 5 мин, центрифугировали 10 мин при 14000 об./мин. Верхний органический слой декантировали, переносили в хроматографическую виалу и

упаривали в испарителе-концентраторе в течение 30 мин при нагревании до 45 °С. Сухой остаток перерастворили в 50 мкл дериватизирующей смеси (*N*-метил-*N*-*трет*-бутилдиметилсилилтрифторацетамид, содержащий 1 % *трет*-бутилдиметилхлоросилана) и выдерживали пробы при 70 °С в течение 30 мин. Далее в виалу с продуктами дериватизации добавляли 300 мкл этилацетата и полученный образец помещали в автосемплер для дальнейшего хроматомасс-спектрометрического анализа. Для хроматографического разделения использовали неполярную капиллярную колонку HP-1 (привитая фаза — 100 % диметилполисилоксан, длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина фазы 0,25 мкм, газ-носитель — гелий 6.0, давление газа-носителя 5 psi). Для разделения смеси веществ был применен следующий режим работы хроматографа: температура инжектора составляла 250 °С, начальная температура печи хроматографа — 130 °С, затем термостатирование в течение 2 мин, после чего осуществлялся нагрев с температурным градиентом 25 °С/мин до 280 °С, затем термостатирование на 280 °С в течение 4 мин. Общее время анализа составило 12 мин. Был выбран следующий режим регистрации масс-спектров: энергия ионизации 70 эВ, температура источника ионов — 230 °С, ионизация типа “электронный удар”, регистрация положительных ионов, сканирование в диапазоне 50 – 400 Да со скоростью 2 скан/с. Объем вводимой пробы — 1 мкл в режиме без деления потока. Давление на инжекторе составляло 23,5 psi. Температура источника ионизации равнялась 230 °С, температура трансферлайна — 280 °С, температура квадруполя — 150 °С. Для разработки метода мониторинга выбранных ионов (SIM-метода) предварительно были сняты масс-спектры целевых соединений в сканирующем режиме в диапазоне 50 – 400 Да. Были получены масс-спектры соединений, представленные на рис. 1 – 3.

После анализа масс-спектров целевых соединений были выбраны следующие параметры для SIM-метода (метода мониторинга выбранных ионов): фрагмент-ион с *m/z* 309 для салициловой кислоты; фрагмент-ион с *m/z* 195 для ацетилсалициловой кислоты; фрагмент-ион с *m/z* 193 для толуиловой кислоты

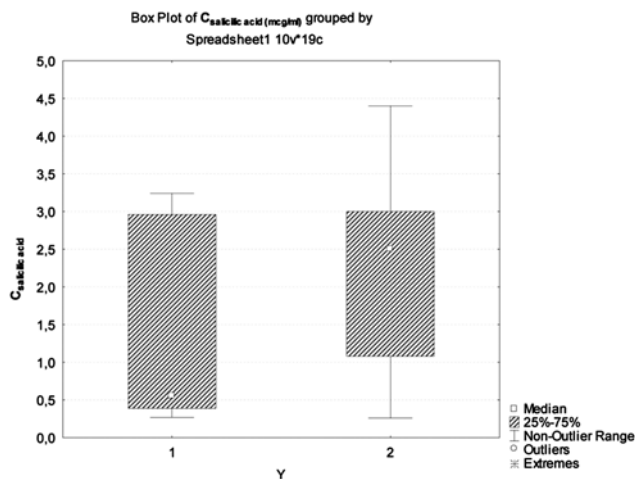


Рис. 6. Средние значения концентраций салициловой кислоты в группе нереспондеров (1) и респондеров (2). По оси ординат — концентрация салициловой кислоты выраженная, мкг/мл

(внутренний стандарт). Параметры хроматографирования были аналогичны таковым для режима сканирования по полному ионному току (см. выше). В указанных условиях время удерживания TBDMS-производных целевых соединений составляло: для толуиловой кислоты — 4,55 мин; для ацетилсалициловой кислоты — 5,24 мин; для салициловой кислоты — 6,25 мин. Типичная масс-хроматограмма вышеуказанных соединений представлена на рис. 4.

Количественный анализ. Калибровочные кривые получали в результате анализа проб плазмы с добавками известных количеств стандартов определяемых соединений. Расчет концентрации салициловой и ацетилсалициловой кислот в плазме крови осуществляли методом внутреннего стандарта по отношению площадей хроматографического пика аналита и внутреннего стандарта. Растворы салициловой и ацетилсалициловой кислот применяли для приготовления растворов рабочих стандартных образцов с плазмой крови с концентрациями 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 мкг/мл. При регрессионном анализе выявляется линейная зависимость между концентрацией салициловой и ацетилсалициловой кислот и отношением площадей хроматографических пиков в интервале от 0,156 до 10 мкг/мл. Калибровочные кривые анализируемых соединений представлены на рис. 5. Градуиро-

вочная зависимость для салициловой кислоты в плазме крови описывалась формулой:

$$C_{СК} = 4,752 \times AR - 0,1301;$$

где $C_{СК}$ — концентрация салициловой кислоты (мкг/мл), AR (Area Ratio) — отношение площадей пиков аналита и внутреннего стандарта. Градуировочная зависимость для ацетилсалициловой кислоты в плазме крови описывалась формулой:

$$C_{АСК} = 15,53 \times AR - 0,2142,$$

где $C_{АСК}$ — концентрация ацетилсалициловой кислоты (мкг/мл); AR (AreaRatio) — отношение площадей пиков аналита и внутреннего стандарта. Коэффициент корреляции R^2 в обоих случаях был не меньше 0,997, что соответствует надлежащей аналитической аппроксимации.

Предел количественного определения метода составил 0,156 мкг/мл.

Для количественной оценки достоверности полученных результатов были определены показатели правильности и прецизионности методики, которые оценивали по 3 концентрационным уровням рабочих стандартных растворов ацетилсалициловой кислоты и салициловой кислоты после 6 определений каждого уровня. **Прецизионность** выражалась в виде коэффициента вариации (% C. V.) для каждой серии образцов согласно уравнению:

$$\frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \%,$$

где SD — стандартное отклонение серии определений; \bar{x} — среднее арифметическое значение полученных концентраций. **Правильность** измерялась как процент отклонения (% dev.) от теоретического значения по формуле:

$$\frac{\bar{x} - \bar{\mu}}{\bar{\mu}} \cdot 100 \%,$$

где \bar{x} — среднее арифметическое значение полученных концентраций. Для метрологической валидации полученной методики определяли точность в течение рабочего дня. Каждый из образцов, предназначенных для контроля качества, анализировали в течение 1 ра-

Таблица 1
Точность определения ацетилсалициловой кислоты в плазме крови в течение рабочего дня

Показатель	Концентрация добавленная, мкг/мл			
	0,625	1,25	5	10
Среднее значение (\bar{x}) найденной концентрации (мкг/мл), $n = 6$	0,69	1,19	4,89	10,28
SD	0,02	0,02	0,04	0,05
% CV	3,47	2,04	0,74	0,47
% dev	10,67	-5,07	-2,27	2,82

Таблица 2
Точность определения салициловой кислоты в плазме крови в течение рабочего дня

Показатель	Концентрация добавленная, мкг/мл			
	0,625	1,25	5	10
Среднее значение (\bar{x}) найденной концентрации (мкг/мл), $n = 6$	0,61	1,26	5,17	10,30
SD	0,03	0,02	0,08	0,09
% CV	5,58	1,19	1,57	0,84
% dev	-2,93	0,80	3,43	3,13

бочего дня (6 определений). Результаты представлены в табл. 1 – 2.

Таким образом, относительная ошибка определения анализируемых соединений не превышала 15 %.

Практическое применение метода. В группе 26 пациентов с ЦВЗ, постоянно принимающих аспирин в качестве антиагрегантного средства (75 – 100 мг/сут) с целью первичной либо вторичной профилактики сосудистых событий, был проведен анализ фармакокинетики ацетилсалициловой кислоты и салициловой кислоты и оценка остаточной реактивности тромбоцитов. Забор проб производился на концентрационном максимуме, который соответствует 2 ч после приёма препарата (согласно литературным данным) и на максимуме антиагрегационного фармакологического эффекта (6 ч после приёма препарата). Оценивали концентрацию ацетилсалициловой кислоты и ее метаболита салициловой кислоты. Концентрация ацетилсалициловой кислоты при первом пробоотборе варьировала в пределах 0,2 – 0,73 мкг/мл, у 13 пациентов аскорбиновая кислота не определялась, концентрация салициловой кислоты находилась в пределах 0,16 – 4,4 мкг/мл. Через 6 ч после приема препарата ацетилсалициловая кислота не определялась ни у одного пациента, концентрация салициловой кислоты варьировала от 0,17 до 3,47 мкг/мл. Как уже указывалось выше, у пациентов всех перечисленных групп были измерены концентрационные значения ацетилсалициловой и салициловой кислоты на прогнозируемом концентрационном максимуме, согласно литературным данным. При анализе концентрационных значений в зависимости от реакции на препараты аскорбиновой кислоты были получены следующие значения. Медианное значение максимальной концентрации C_{max} салициловой кислоты в группе пациентов, восприимчивых к терапии (далее — респондеров) составило 2,51 [0,80; 2,96] мкг/мл. В группе пациентов, нечувствительных к антиагрегантной терапии (нереспондеров), медианное значение C_{max} салициловой кислоты было ниже и составляло 0,54 [0,33; 2,43]. Таким образом, были получены различия показателей, которые, однако не являлись достоверно значимыми

(рис. 6). По-видимому, это связано с большим разбросом концентрационных значений в выборке. Обнаруженная тенденция нуждается в дальнейшем анализе на большей группе пациентов. Ацетилсалициловая кислота обнаруживалась не во всех образцах пациентов, что, по всей видимости, связано с высокой скоростью ее метаболизма. Однако важно отметить, что все пациенты, у которых данное вещество обнаруживалось в плазме крови, демонстрировали хороший фармакологический ответ на лекарственную терапию. Медианное значение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в указанной группе составило 26 % [21 %; 33 %] и было достоверно ниже, чем в группе пациентов, у которых ацетилсалициловая кислота не определялась — 43 % [40 %; 44 %].

ЛИТЕРАТУРА

1. L. Macchi, N. Sorel, L. Christiaens, *Cur. Pharm. Des.*, **12**(2), 251 – 258 (2006).
2. A. D. Michelson, M. Cattaneo, J. W. Eikelboom, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **3**(6), 1309 – 1311 (2005).
3. T. Grosser, S. Fries, J. A. Lawson, et al., *Circulation*, **127**(3), 377 – 385 (2013).
4. F. Kees, D. Jehnich, H. Grobecker, *J. Chromatogr. B, Biomed. Applicat.*, **677**(1), 172 – 177 (1996).
5. G. P. McMahon, M. T. Kelly, *Anal. Chem.*, **70**(2), 409 – 414 (1998).
6. S. R. Polagani, N. R. Pilli, V. Gandu, *J. Pharm. Anal.*, **2**(3), 206 – 213 (2012).
7. S. Puram, R. Batheja, P. A. Vivekanand, et al., *Asian. J. Chem.*, **28**(11), 2403 – 2406 (2016).
8. D. Sirok, M. Pátfalusi, G. Szelezcky, et al., *Microchem. J.*, **136**(1), 200 – 208 (2018).
9. З. А. Суслина, В. Г. Ионова, Е. Г. Демина, Патент РФ № 2188419, *Способ исследования антиагрегационного действия препаратов с помощью определения агрегации тромбоцитов*, Москва (2002).
10. X. Chen, G. Bao, Y. Hua, et al., *J. Molec. Neurosci.: MN*, **38**(2), 201 – 206 (2009).
11. K.-R. Kim, W.-H. Shim, Y.-J. Shin, et al., *J. Chromatogr. A*, **641**(2), 319 – 327 (1993).
12. A. Battezzati, G. Fiorillo, A. Spadafranca, et al., *Anal. Biochem.*, **354**(2), 274 – 278 (2006).
13. S. Almeida, A. C. Spinola, A. Filipe, et al., *Arzneimittel-Forschung*, **57**(5), 249 – 253 (2007).

Поступила 21.04.17

APPLICATION OF GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY FOR ANALYSIS OF THE BLOOD LEVEL OF SALICYLATES IN PATIENTS WITH CEREBROVASCULAR DISEASE TAKING ASPIRIN AS ANTIPLATELET THERAPY

D. A. Abaimov*, L. R. Spavronskaya, A. A. Shabalina, M. M. Tanashyan, and A. K. Sariev

Research Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia

* e-mail: abaidenis@gmail.com

A gas-chromatography/mass-spectrometry method was developed and metrologically validated for the quantitative determination of salicylic acid and acetylsalicylic acid (ASA) in human plasma. The method was used to measure the concentrations of these acids in blood plasma samples of 26 patients with cerebrovascular disease, taking aspirin in 75 – 100 mg doses as antiplatelet therapy for primary or secondary prevention of thrombotic events. ASA was detected in less than half of the samples, which can be explained by the high rate of its metabolism. It was found that patients with ASA detected demonstrated a more pronounced pharmacological response to the antiplatelet therapy.

Keywords: drug resistance; salicylates; aspirin; antiplatelet agents; drug monitoring; mass spectrometry; gas chromatography; derivatization.