

Количественное определение препаратов для терапии COVID-19 в сыворотке и плазме крови с помощью жидкостной хроматомасс-спектрометрии

Д. А. Фармаковский

Shimadzu Europa GmbH

Quantitative determination of drugs for therapy of COVID-19 in serum and plasma using liquid chromatography – mass-spectrometry

D. A. Farmakovskiy

Shimadzu Europa GmbH

Резюме

Разработаны методы количественного определения в плазме крови лекарственных препаратов, которые обладают потенциальной эффективностью при лечении заболеваний, вызванных новой коронавирусной инфекцией. Используя жидкостную тандемную масс-спектрометрию, можно количественно определять с высокой точностью от 1 до 9 препаратов в широком терапевтическом диапазоне концентраций. Метод демонстрирует хорошую воспроизводимость результатов, он может быть использован при разработке новых лекарственных средств, при клинических исследованиях, а также для терапевтического лекарственного мониторинга реальных пациентов.

Ключевые слова: COVID-19, гидроксихлорохин, фавипиравир, хроматомасс-спектрометрия, терапевтический лекарственный мониторинг.

Summary

There was developed a method for quantitation of the drugs which could be effective for COVID-19 treatment. Using tandem liquid mass-spectrometry it is possible to simultaneously quantify with high accuracy and precision up to 9 medicines in human plasma. This method could be used for new drug development as well as for clinical trials and therapeutic drug monitoring in real clinical practice.

Key words: COVID-19, hydroxychloroquine, favipiravir, mass-spectrometry, therapeutic drug monitoring.

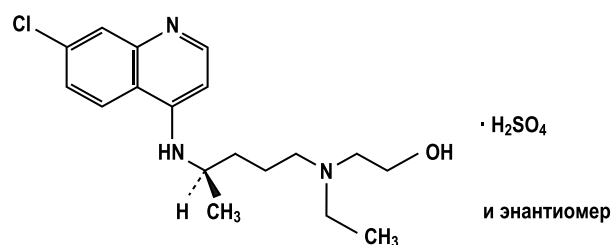
Во многих лабораториях и лечебных учреждениях во всем мире проводятся интенсивные исследования по поиску решения для терапии заболеваний, связанных с пандемией коронавирусной инфекции COVID-19. Ряд препаратов, таких как фавипиравир, ремдесивир, фидоксидхлорохин, дезетилхлорохин, хлорохин, азитромцин, ритонавир, лопинавир, используемых отдельно или в сочетании с другими препаратами, демонстрируют многообещающие результаты. Однако для отработки максимально эффективных схем лечения, например выбора оптимальной дозировки, требуется всестороннее исследование фармакокинетики препаратов в условиях протекания заболеваний, вызванных коронавирусной инфекцией.

Корпорация Shimadzu, один из ведущих мировых производителей медицинского и аналитического оборудования, в текущей ситуации прикладывает все возможные усилия, чтобы помочь исследователям решить эту проблему максимально эффективным образом.

Ниже приведен пример использования аналитического оборудования Shimadzu для разработки методов количественного определения потенциально эффективных лекарственных препаратов для терапии COVID-19.

Количественное определение сульфата гидроксихлорохина

Сульфат гидроксихлорохина (HCQ), широко известный препарат для профилактики и лечения малярии, рассматривается также и как средство для терапии заболеваний, вызванных новым коронавирусом (COVID-19). Ниже представлен метод количественного определения HCQ в плазме крови с использованием высокоэффективной



Сульфат гидроксихлорохина

$C_{18}H_{28}ClN_3O_5S$

MW 433.95

CAS#: 747-36-4

Рисунок 1. Структурная формула сульфата гидроксихлорохина.

жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной жидкостной масс-спектрометрией. С помощью этого метода концентрацию HCQ в плазме можно точно определить в течение 10 минут после простого осаждения белка ацетонитрилом. Метод может быть успешно использован в реальной клинической практике. Он отличается простотой, демонстрирует высокую чувствительность, широкий динамический диапазон и хорошую воспроизводимость получаемых результатов.

Инструменты и методы

Использовали тандемный квадрупольный жидкостный хроматомасс-спектрометр LCMS-8050 (Shimadzu) в сочетании с системой ультравысокоэффективной хроматографии Nexera X2 (Shimadzu) (рис. 2). Условия анализа приведены в табл. 1, параметры работы масс-спектрометра в режиме регистрации множественных переходов (MRM) — в табл. 2.



Рисунок 2. Тандемный квадрупольный жидкостный хромато-масс-спектрометр LCMS-8050 (Shimadzu) в сочетании с системой ультравысокоэффективной хроматографии Nexera X2 (Shimadzu).

Таблица 1
Условия хроматографического разделения
и параметры работы масс-спектрометра

Хроматографическая колонка	Shim-pack GIST C18-AQ, 100 × 2,1 мм, 1,9 мкм
Подвижная фаза	(А) 0,1% муравьиная кислота + 50 мМ ацетата аммония в воде (Б) ацетонитрил + метанол (1:1)
Поток подвижной фазы	0,5 мл/мин
Температура колонки	40 °С
Режим элюирования	Изократический поток, 20% фазы (Б)
Режим ионизации	Электрораспыление, положительная ионизация
Напряжение на интерфейсе МС	4,5 кВ
Поток газа-распылителя	Азот, 3 мл/мин
Поток горячего газа	Воздух, 10 мл/мин
Поток газа-осушителя	Азот, 10 мл/мин
Температура источника ионизации	400 °С
Температура линии десольватации	250 °С

Таблица 2
Параметры определения сульфата гидроксихлорохина
в режиме регистрации MRM-переходов

Аналит	CAS №	m/z иона- предшественника [M+H] ⁺	m/z фрагментного иона
Сульфат гидроксихлорохина	747-36-4	336,20	247,10* 158,15
Дифосфат хлорохина	50-63-5	320,20	247,10

Примечание: * – для количественной оценки.

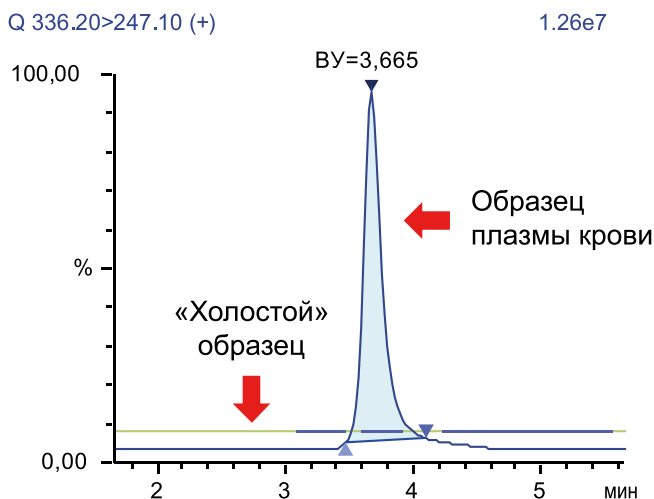


Рисунок 3. MRM-хроматограмма HCQ в «холостой» пробе и в образце плазмы крови.

Приготовление образцов

Для приготовления подвижной фазы использовали реактивы класса chromatography grade, которые хранились при комнатной температуре.

Маточный раствор гидроксихлорохина (10 мкг/мл) готовили путем растворения навески HCQ в смеси ацетонитрил/вода (1:1 v/v), полученный раствор хранили при температуре –20 °С. Рабочие растворы HCQ (5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1 000, 2 000, и 5 000 нг/мл) готовили путем соответствующего разведения маточного раствора смесью ацетонитрил/вода и также хранили при –20 °С. Аналогично готовили маточный (10 мкг/мл) и рабочий (1 мкг/мл) растворы внутреннего стандарта, дифосфата хлорохина (CQ). Маточный раствор CQ хранился при –4 °С, а рабочий — при –20 °С.

Для приготовления калибровочных стандартов 5 мкл рабочего раствора HCQ соответствующей концентрации смешивали с 95 мкл плазмы крови человека, тщательно перемешивали, доводили до финального объема (500 мкл) ацетонитрилом и далее центрифугировали в течение 10 мин при 14000 об./мин. Для калибровки использовали 2 мкл полученного супернатанта. По аналогичной схеме готовили контрольные и холостые образцы. В первом случае использовали рабочие растворы HCQ с концентрацией 5, 200 и 4000 нг/мл, во втором — 5 мкл смеси ацетонитрила и воды. Для оценки эффекта матрицы готовили две серии образцов. Первую серию готовили аналогично контрольным образцам с использованием тех же концентраций рабочего раствора HCQ, при приготовлении второй серии вместо плазмы крови использовали деионизованную воду. Влияние матрицы оценивали по формуле

$$\text{Matrix effect (\%)} = \frac{\text{Peak area in spiked human plasma sample}}{\text{Peak area in spiked Milli-Q® water sample}} \times 100\%$$

$$\text{Эффект матрицы} = \frac{\text{Площадь пика (образец плазмы)}}{\text{Площадь пика (образец с деионизованной водой)}} \times 100\%$$

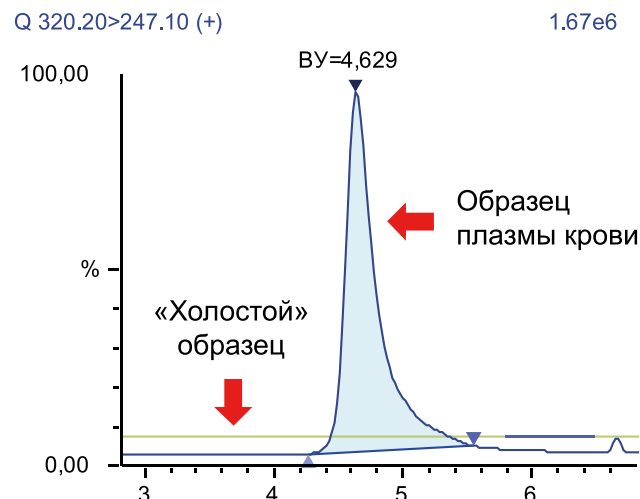


Рисунок 4. MRM-хроматограмма CQ в «холостой» пробе и в образце плазмы крови.

Результаты

Селективность

Как видно из рис. 3 и 4, ни HCQ, ни CQ не идентифицируются в холостых пробах. Также не наблюдается интерференции между исследуемым соединением и внутреним стандартом.

Диапазон линейности

Концентрации калибровочных стандартов составили 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0 и 500,0 нг/мл соответственно. В табл. 3 представлены результаты калибровки, а на рис. 5 приведен калибровочный график.

Влияние матрицы образца

Результаты исследования влияния матрицы образца на результаты анализа (повторность измерений равна 3) представлены в табл. 4.

Как видно из таблицы, влияние матрицы на точность получаемых результатов находится в пределах 98,31–108,17%.

Точность и воспроизводимость результатов

Точность результатов анализа и их воспроизводимость оценивалась по результатам девяти измерений в течение дня с использованием трех контрастных концентраций HCQ. Полученные данные приведены в табл. 5.

Стабильность

Стабильность результатов оценивали после 10 часов после проведения первой серии анализов. В течение этого времени исследуемые образцы хранились в термостате автодозатора при 6 °C. Результаты приведены в табл. 6.

Заключение

Был разработан метод количественного определения сульфата гидроксихлорохина в плазме крови, демонстрирующий точные и воспроизводимые результаты в тера-

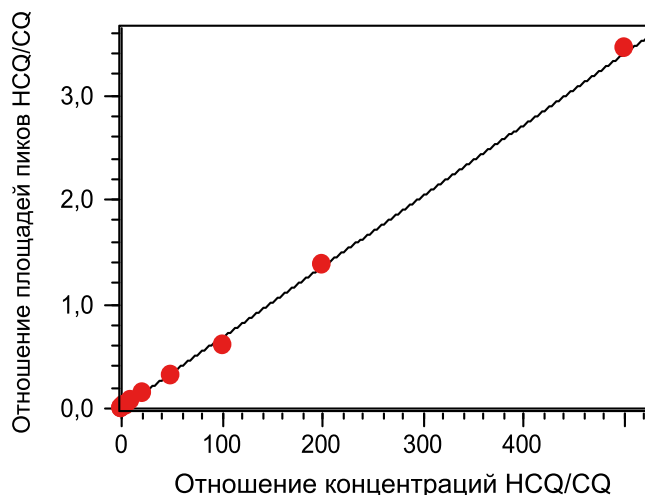


Рисунок 5. Калибровочный график HCQ, полученный с помощью образцов плазмы крови.

певтическом диапазоне концентраций 0,5–500,0 нг/мл. Метод может быть использован как в ходе клинических исследований новых лекарственных препаратов для терапии COVID-19, так и для терапевтического лекарственного мониторинга пациентов.

Метод одновременного количественного определения девяти препаратов

Входящий в состав корпорации Shimadzu французский производитель высококачественных реагентов и стандартов для медицины и аналитической химии — компания Alsachim недавно представила решение для одновременного определения девяти потенциально эффективных для терапии COVID-19 препаратов. Во всем мире данный метод был использован более чем в 50 % клинических исследований, проведенных с пациентами, инфицированными новой коронавирусной инфекцией.

Таблица 3
Результаты количественного определения сульфата гидроксихлорохина

Аналит	Формула	Линейный диапазон (нг/мл)	Точность, %	Коэффициент корреляции, r
Сульфат гидроксихлорохина	$Y = (0,00140144) X + 0,000398161$	0,5–500,0	90,6–110,0	0,9988

Примечание: Y – отношение площади пика HCQ к площади пика CQ; X – отношение концентраций HCQ и CQ.

Таблица 4
Влияние матрицы образца (плазмы крови) на результаты количественного определения HCQ

Уровень концентрации	Концентрация, нг/мл	Эффект матрицы, %	
		Внутренний стандарт	Сульфат гидроксихлорохина
LOQ	0,50		108,17
MQC	20,00		105,52
HQC	400,00		98,31
Внутренний стандарт		105,72	

Таблица 5
Результаты количественного определения сульфата гидроксихлорохина

Аналит	Концентрация, нг/мл	Воспроизводимость, RSD%	Точность, %
Сульфат гидроксихлорохина	0,50	8,33	106,02
	20,00	5,19	101,83
	400,00	1,57	97,91

Таблица 6
Результаты, полученные после 10-часовой инкубации образцов в автодозаторе

Аналит	Концентрация, нг/мл	Воспроизводимость, RSD%	Точность, %
Сульфат гидроксихлорохина	0,50	7,33	94,72
	20,00	4,56	98,01
	400,00	1,76	96,30

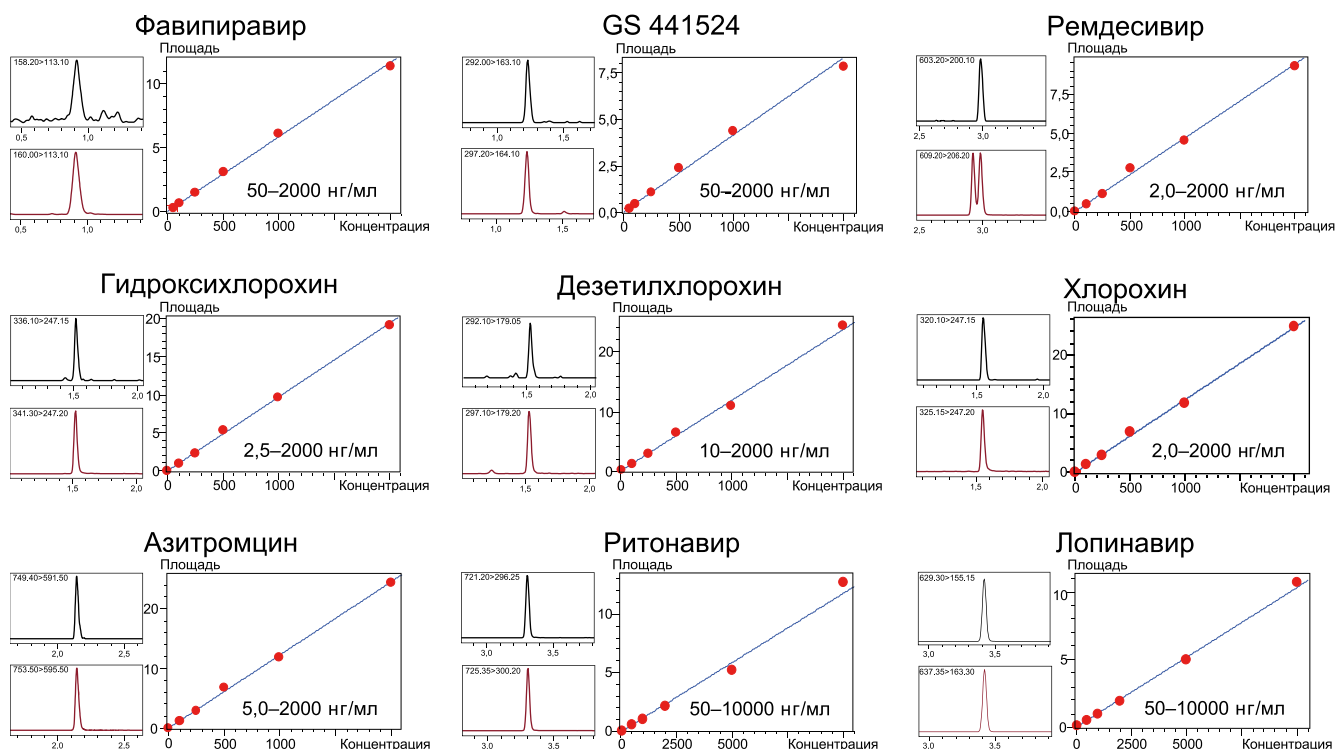


Рисунок 6. Калибровочные графики для 9 препаратов.

Инструменты и методы

Метод анализа был разработан с использованием девяти препаратов активных ингредиентов (фавипиравир, GS 441524, ремдесивир, гидроксихлорохин, дезетилхло-

рохин, хлорохин, азитромцин, ритонавир, лопинавир) и их меченых стабильными изотопами аналогов, используемых в качестве внутренних стандартов. Так же, как и в примере выше, для анализа использовали связку жидкостного тандемного квадрупольного масс-спектрометра LCMS-8050 и ВЭЖХ Nexera X2. Условия анализа приведены в табл. 7, параметры градиентного элюирования — в табл. 8, а режимы работы масс-спектрометра — в табл. 9.

Таблица 7
Условия хроматографического разделения
и параметры работы масс-спектрометра

Хроматографическая колонка	С 18, 50,0 × 2,1 мм, 5,0 мкм
Подвижная фаза	(А) 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде (Б) 0,1 % раствор муравьиной кислоты в метаноле
Поток подвижной фазы	0,5 мл/мин
Температура колонки	30 °С
Режим ионизации	Электрораспыление, положительная ионизация
Поток газа-распылителя	Азот, 2 мл/мин
Поток горячего газа	Воздух, 10 мл/мин
Поток газа-осушителя	Азот, 10 мл/мин
Температура источника ионизации	300 °С
Температура линии десольватации	200 °С

Таблица 8
Параметры градиентного элюирования

Время, мин	Концентрация подвижной фазы (Б)
0,00	1
3,00	99
4,00	99
4,50	1
6,00	1

Таблица 9
Параметры определения девяти препаратов в режиме регистрации MRM-переходов

Аналит	m/z иона-предшественника	m/z фрагментного иона
Фавипиравир	158,20	113,10 85,10
GS 441524	292,00	163,10 147,10
Ремдесивир	603,20	200,10 402,20
Гидроксихлорохин	336,10	247,15 179,10
Дезетилхлорохин	292,10	179,05 114,20
Хлорохин	320,10	247,15 142,20
Азитромцин	749,40	591,50 158,20
Ритонавир	721,20	296,25 228,25
Лопинавир	629,30	155,15 447,30

Таблица 10
Результаты количественного определения девяти лекарственных препаратов

	Фавипиравир			GS441524			Ремдесивир		
Концентрация, нг/мл	50	100	1000	50	100	1000	25	100	1000
Среднее измеренное значение, нг/мл	49,8	99,8	1092,5	47,6	99,6	1035,2	23,1	97,8	988,9
RSD, %	4,4	8,6	5,90	10,60	6,9	4,6	4,1	3,7	1,9
	Гидроксихлорохин			Дезетилхлорохин			Хлорохин		
Концентрация, нг/мл	25	100	1000	50	100	1000	25	100	1000
Среднее измеренное значение, нг/мл	24,4	96,6	1003,0	47,6	95,2	949,2	24,2	95,6	963,2
RSD, %	3,6	3,0	2,4	4,4	2,2	5,6	3,3	3,0	1,8
	Азитромцин			Ритонавир			Лопинавир		
Концентрация, нг/мл	25	100	1000	100	500	1000	100	500	1000
Среднее измеренное значение, нг/мл	24,9	97,2	962,2	98,3	498,6	891,3	92,1	503,7	917,2
RSD, %	6,6	2,5	2,0	3,2	2,0	3,1	2,0	0,8	1,3

Приготовление образцов

50 мкл плазмы крови помещали в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 200 мкл метанола с предварительно добавленным внутренним стандартом, перемешивали в течение 1 минуты. Полученную смесь центрифугировали при 15000 об./мин. К 50 мкл супернатанта добавляли 100 мкл подвижной фазы (Б). 1 мкл финальной смеси использовали для анализа.

Результаты

Калибровочные графики (коэффициент корреляции более 0,99) в диапазоне концентраций до 20 мкг/мл для семи аналитов и до 10 мкг/мл для ритонавира и лопинавира представлены на рис. 6, а данные по воспроизводимости результатов — в табл. 10.

навира представлены на рис. 6, а данные по воспроизводимости результатов — в табл. 10.

Заключение

Разработанное решение позволяет быстро (время анализа менее 10 минут) и надежно определять одновременно до девяти лекарственных препаратов, используемых для терапии COVID-19. Компания Shimadzu может предложить законченное решение, включающее как аппаратное обеспечение, полный набор стандартов и реактивов для проведения анализа, так и всестороннюю методическую поддержку пользователей.

Для цитирования: Фармаковский Д. А. Количественное определение препаратов для терапии COVID-19 в сыворотке и плазме крови с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Медицинский алфавит. 2020;(27):43–47. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-27-43-47>.

For citation: Farmakovskiy D. A. Quantitative determination of drugs for therapy of COVID-19 in serum and plasma using liquid chromatography-mass spectrometry. Medical alphabet. 2020; (27): 43–47. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-27-43-47>.



Разработана технология создания антибактериальных масок

Ученые НИТУ «МИСиС» разработали и запатентовали технологию, которая позволяет наделять тканевые медицинские маски антибактериальным эффектом. Такие свойства достигаются благодаря пропитке изделий в растворе наночастиц серебра.

Тканевые медицинские маски используются не только как часть экипировки врачей в случае оперативного вмешательства, но и для дополнительной защиты при медицинских осмотрах, а также в условиях стационара. Сложная эпидемиологическая ситуация вынудила людей использовать маски и в бытовых условиях – во время передвижения на общественном транспорте, для похода в магазин, на прогулках.

Несмотря на то что тканевые маски задерживают определенную часть загрязнений, они слабо препятствуют проникновению в организм патогенов. Решить эту проблему можно при помощи дополнительной обработки масок, которая позволит наделять их бактерицидными свойствами.

Ученые НИТУ «МИСиС» разработали и запатентовали (пат. РФ № RU 2426484C 1 от 20.08.2011) технологию создания в тканевых масках защитной антибактериальной мембраны из наночастиц серебра, так как оно обладает бактерицидными свойствами и при взаимодействии с клетками патогенов разрушает их оболочку.

В целом разработка антибактериальных масок – не первичная цель коллектива, и основная задача – изучение поведения металлов под наносекундным лазерным воздействием. Тем не менее, по словам ученых, здесь есть куда двигаться дальше: например, можно попробовать осаждать на ткани наночастицы золота, палладия и платины – материалов, также обладающих бактерицидными свойствами.