УДК 543.632

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИБУТИЛФОСФАТА И ХОЛАТА НАТРИЯ В ПРЕПАРАТАХ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС

© В. В. Хасанов[1], К. А. Дычко[1], Т. Т. Куряева[1], В. В. Хасанов[2]

Статья поступила 11 июля 2014 г.

Трибутилфосфат и холат натрия используют при инактивации вирусов в препаратах из донорской крови, контролируя содержание этих соединений в готовых продуктах. Предложен простой способ пробоподготовки и одновременного определения остаточных количеств трибутилфосфата и холата натрия в препаратах крови методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с МС детектированием. Подготовка пробы проста и включает лишь осаждение белков, способ позволяет определять до 12,5 и 0,35 мг/л холата натрия и трибутилфосфата с относительной погрешностью не более 11 и 7 % соответственно.

Ключевые слова: трибутилфосфат; холат; дезоксихолат; препараты крови; ВЭЖХ-МС.

Актуальность определения трибутилфосфата (ТБФ) и холата натрия (ХН) обусловлена их использованием при сольвент-детергентной обработке наряду с другими инактиваторами вирусов в производстве препаратов крови из донорского материала и необходимостью контроля содержания этих соединений в готовом продукте [1 – 2].

Существуют разнообразные способы раздельного определения фосфорорганических соединений и детергентов в различных объектах. Так, обзорная статья [3] посвящена определению холевых кислот. Наиболее широко применяемым методом определения указанных соединений является газовая хроматография, в том числе с масс-спектрометрическим [1, 4 – 6] и пламенно-фотометрическим детектированием [7].

Авторы работы [8] отмечают, что главной проблемой при определении желчных кислот в биологических образцах является неполная открываемость аналитов вследствие плохой экстракции. Процедуры экстракции желчных кислот из тканей исследованы в работе [9].

Авторы работы [10] отмечают, что многоэтапная пробоподготовка при определении желчных кислот методом газовой хроматографии, включающая экстракцию, фракционирование, сольволиз, гидролиз и модификацию, приводит к потерям контролируемого соединения и усложняет определение, что требует применения подходящих внутренних стандартов, добавляемых в образцы еще до начала обработки. Для определения методом газовой хроматографии холевые кислоты чаще всего модифицируют этерификацией карбоксильной группы и силилированием (триметилсиланом) гидроксильных групп [8]. Известен способ, когда с целью модификации применяют пентафторпропанол и пентафторпропионовый ангидрид [1]. В последнее время все шире применяют метод ВЭЖХ-МС. Авторы работы [11] показали корреляцию результатов, полученных методами ВЭЖХ и ГХ, причем метод ВЭЖХ-МС/МС оказался более простым и чувствительным.

Известен способ определения остаточных количеств дезоксихолата натрия (ДХН) в виде комплекса с метиленовым голубым, в составе которого ДХН извлекают из ткани хлороформом, с последующим измерением оптической плотности при 653 нм [12].

Поскольку ТБФ и ХН применяют для инактивации вирусов в препаратах донорской крови одновременно, их раздельное определение удваивает трудоемкость анализа. Проблемы же одновременного определения ТБФ и ХН вытекают из их разной химической природы и предельно допустимого содержания в анализируемом объекте, что нужно учитывать при подготовке пробы. Цель данной работы — разработка способа пробоподготовки и одновременного определения ТБФ и ХН в препаратах крови методом ВЭЖХ-МС с минимальными трудозатратами.

Аппаратура, реактивы и определяемые соединения. Были использованы реагенты трибутилфосфат (99 %, Sigma), холат натрия (99 %, Sigma), дезоксихолат натрия (99 %, Sigma), раствор альбумина 10 % (ФГУП «НПО Вирион»).

Для анализа использовали ВЭЖХ систему Surveyor (Thermo, США) с МС детектором «ионная ловушка» LCQ Advantage MAX (Thermo, США).

Параметры ВЭЖХ разделения. Анализ осуществляли на колонке HyperSil Gold C18 4 × 150 мм, 5 мкм (Thermo, США). Условия ВЭЖХ разделения подбирали таким образом, чтобы ХН, ТБФ и ДХН отделить друг от друга и от неудерживаемых в обращенно-фазовой хроматографии полярных соединений. Наилучшие результаты были получены при использовании градиентного элюирования по следующей программе:

[1] Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия; e-mail: xasanov@xf.tsu.ru
[2] Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия.

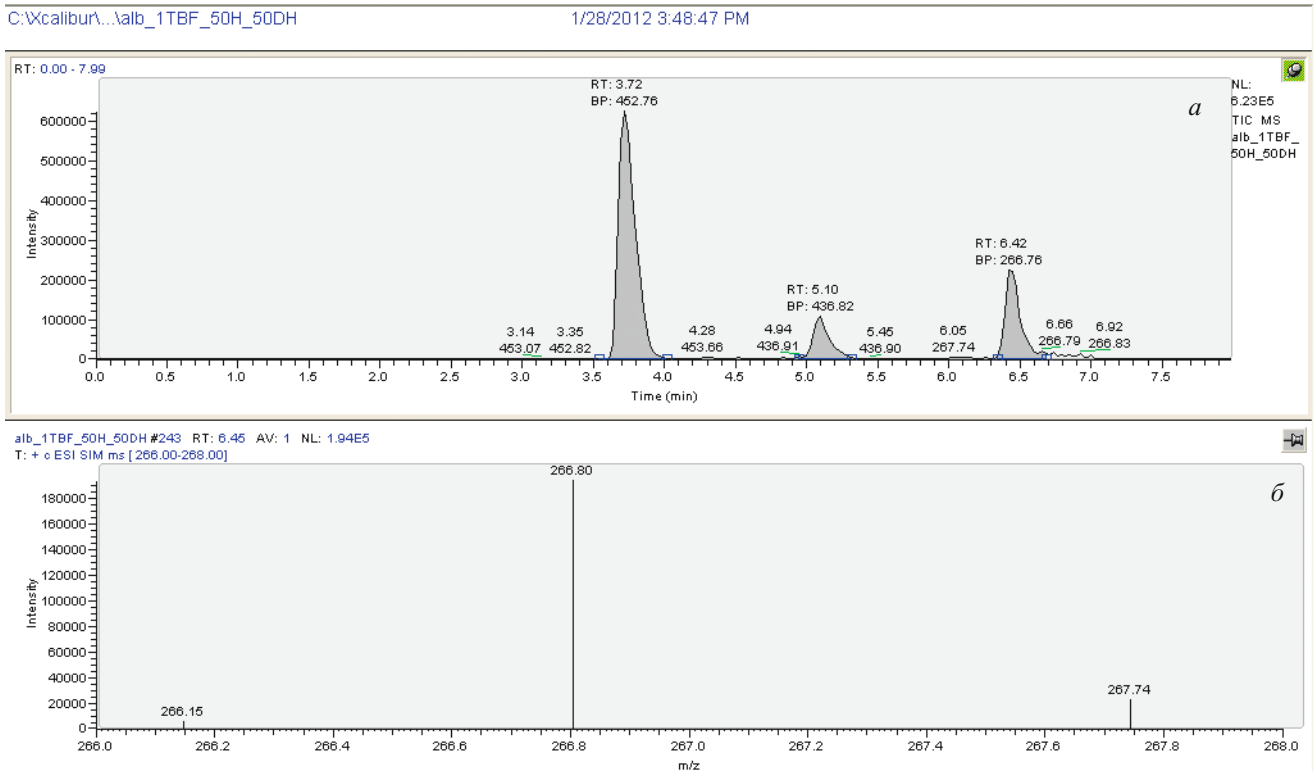

Рис. 1. Хроматограмма (*а*) и масс-спектр (*б*) стандартного 5 %-ного альбуминового раствора ТБФ (1 мг/л), ХН (50 мг/л) и ДХН (50 мг/л)

от 0 до 0,6 мин — 30 % элюента А (ввод пробы), от 0,6 до 6,0 мин — 5 % А; 6,0 – 11,5 мин — 30 % А, стоп. В качестве элюента А использовали 0,2 %-ный раствор муравьиной кислоты в воде, элюент В — 100 % ацетонитрил (CH_3CN). Скорость потока элюента — 0,5 мл/мин, объем пробы — 10 мкл. Температура — комнатная (20 °С). Времена выхода компонентов в таких условиях составили: (3,72 ± 0,02) мин для холата натрия, (5,12 ± 0,05) мин для дезоксихолата и (6,48 ± 0,06) мин для трибутилфосфата.

Параметры МС детектирования. МС детектор и интерфейс ESI (электроспрей) настраивали по каждому из трех определяемых соединений с помощью встроенной программы. Вручную подбирали только температуру капилляра (250 °С) и скорости расхода азота (Sheath Gas и Sweep Gas — 25 и 9 арбитражных единиц соответственно по терминологии фирмы Thermo), обеспечивающие максимальный сигнал молекулярного иона. Детектирование осуществляли в режиме SIM по m/z = 453, 437 и 267 для ХН, ДХН и ТБФ соответственно. Ширина окна фильтра масс составляла во всех случаях 2 а.е.м. ХН и ДХН регистрировали в режиме ESI– ($[M-H]^-$), а ТБФ — в режиме ESI+ ($[M+H]^+$). Переключение режимов детектирования осуществлялось автоматически по ходу процесса ВЭЖХ разделения.

Таблица 1. Степень извлечения ТБФ, ХН и ДХН (%) при разных условиях пробоподготовки (n = 3; P = 0,95)

Аналит	CCl_3COOH	CH_3CN	$CH_3CN + NH_3$
ХН	0	12 ± 3	88 ± 3
ТБФ	93 ± 3	92 ± 3	89 ± 3
ДХН	—	—	88 ± 3

Подготовка образца, рабочих и калибровочных растворов. Готовили водные растворы холата и дезоксихолата натрия с концентрацией около 1000 мг/л (в пересчете на холевые кислоты). Полученные рабочие растворы устойчивы при 4 °С в темноте в течение двух недель. Растворы для градуировки готовили разбавлением исходных 5 %-ным раствором альбумина. Раствор внутреннего стандарта (ДХН) получали разведением рабочего раствора ДХН водой до концентрации 50 мг/л. Из трибутилфосфата готовили рабочий раствор с концентрацией 50 мг/л. Полученный раствор можно хранить в темноте при 4 °С в течение недели.

Подготовку образца препарата крови или градуировочного раствора проводили по одинаковой схеме, предусматривающей осаждение белков. Для этой цели были изучены ацетонитрил и трихлоруксусная кислота в виде 30 %-ного водного раствора. Применение трихлоруксусной кислоты для осаждения белков дает отличные результаты при определении трибутилфосфата, но ее использование при совместном определении ТБФ и холевой кислоты оказалось неприемлемым по той причине, что в таких условиях происходит полная потеря ХН в результате соосаждения с белком, что подтвердили наши эксперименты. В табл. 1 приведены данные по степени извлечения определяемых со-

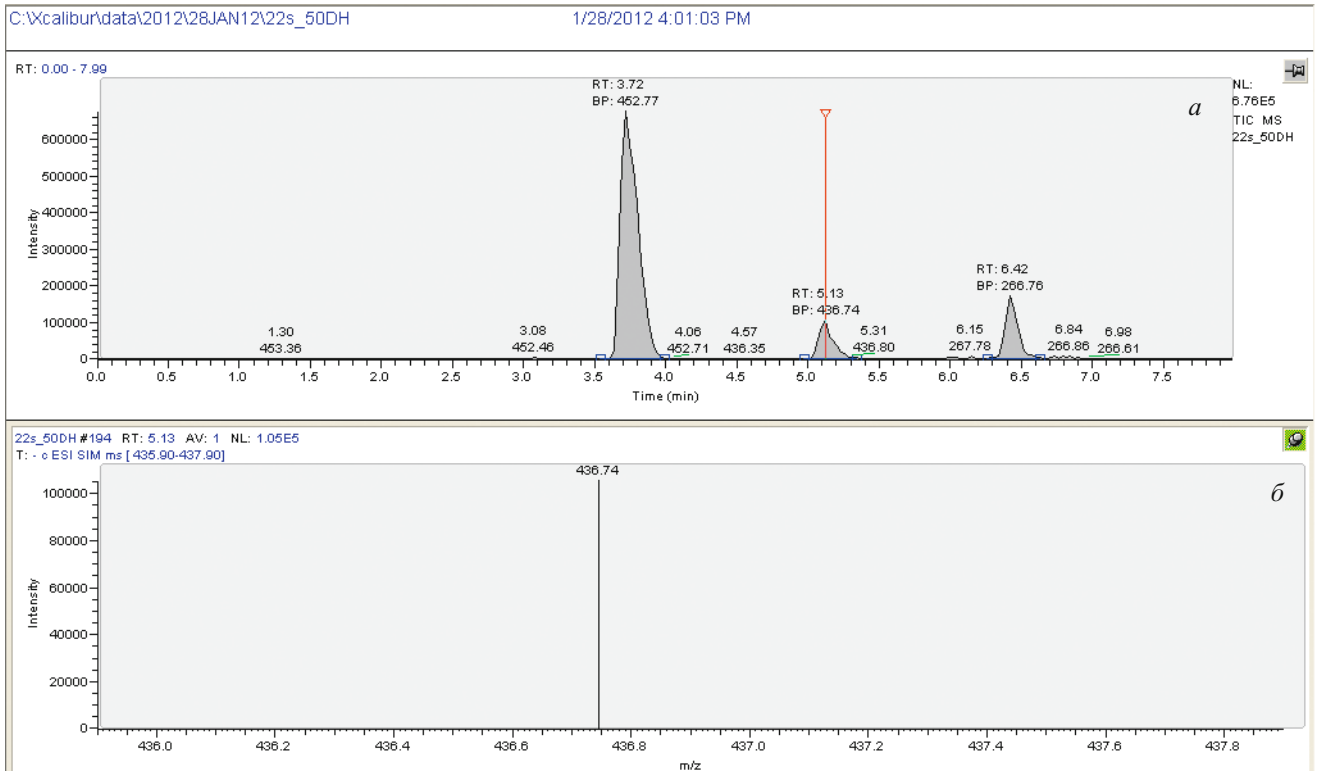

Рис. 2. Хроматограмма (*а*) и масс-спектр (*б*) производственного образца иммуноглобулина «22s» с добавлением внутреннего стандарта ДХН (50 мг/л)

единений при разных условиях подготовки пробы. Степень извлечения определяли при сравнении с площадью пика соединения из стандартного раствора в воде (принято за 100 %).

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что для извлечения холевой кислоты наиболее подходит щелочная среда, создаваемая добавлением раствора аммиака. В кислой среде молекула холевой кислоты теряет заряд (из-за протонирования ее аниона) и соосаждается с белком. В щелочной среде, создаваемой аммиаком, кислота ионизирована и соосаждение резко уменьшается, степень извлечения по сравнению с нейтральными растворами увеличивается более чем в шесть раз, с 10 – 15 до 90 %. Однако в щелочной среде становится нестабильным трибутилфосфат и, соответственно, снижается его степень извлечения. Что касается внутреннего стандарта (ДХН), его степень извлечения подчинялась тем же закономерностям, что и для холата натрия. Нужно только отметить, что в условиях ВЭЖХ-МС интерфейса с электрораспылением (ESI) дезоксихолат натрия дает впятеро меньший сигнал на такое же количество соединения по сравнению с холатом натрия.

Оптимальный вариант подготовки образца выглядел следующим образом. В микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 – 2 мл помещали 100 мкл анализируемого препарата (образца), прибавляли 50 мкл 30 %-ного раствора аммиака в воде, 100 мкл раствора ДХН с концентрацией 50 мг/л (внутренний стандарт) и 750 мкл ацетонитрила, встряхивали (вортекс) 1 мин и центрифугировали 3 мин при 10000 – 14000 мин$^{-1}$. Надосадочную жидкость отделяли и анализировали.

Градуировочные зависимости для определения ХН и ДХН линейны в диапазоне концентраций от 2 до 200 мг/л, а в случае ТБФ — от 0,5 до 10 мг/л (при условии 10-кратного разбавления при пробоподготовке). Остаточные количества реагентов, определенные [1] на основании требований Европейской фармакопеи, сведений о токсичности реагентов и опыта зарубежных производителей и составляющие для ТБФ не более 2 мг/л, для холата натрия не более 100 мг/л,

Таблица 2. Метрологические характеристики определения трибутилфосфата и холата натрия

Аналит	*A*	σ	*B* (*S*)	*R*	*N*	*LOD*, мг/л	*LOQ*, мг/л
ХН	361,5	123,9	98,4	0,9944	9	4,1 ± 0,5	12,5 ± 2,5
ТБФ	33,4	175,8	4979	0,9963	9	0,12 ± 0,10	0,35 ± 0,20

Примечание. *LOD* (предел обнаружения) = 3,3σ/*S*; *LOQ* (минимальное определяемое содержание) = 10σ/*S*, где σ — стандартное отклонение градуировочной зависимости; *S* — наклон градуировочной зависимости (*B*), описываемой уравнением $Y = A + BX$; *R* — коэффициент корреляции; *N* — число измерений.

Таблица 3. Погрешность определения трибутилфосфата и холата натрия по предложенной методике

Введено, мг/л	ХН			ТБФ		
	8,0	20,0	50,0	0,50	1,00	1,50
S (n = 3)	1025	2501	5230	2527	5004	7507
σ	111	142	221	158	265	208
ΔS	126	161	250	179	300	236
δ	10,8	5,7	4,2	6,3	5,3	2,8
Найдено мг/л	8,0 ± 0,9	20,0 ± 1,1	50,0 ± 2,1	0,50 ± 0,03	1,00 ± 0,05	1,50 ± 0,04

Примечание. S — средняя площадь пика (из трех измерений); σ — стандартное отклонение; ΔS — доверительный интервал; δ — относительная погрешность, %.

находятся в линейном динамическом диапазоне предложенной методики. Ее метрологические характеристики приведены в табл. 2.

Данные табл. 2 получены при анализе стандартных 5 %-ных альбуминовых растворов ТБФ и ХН по трем измерениям для каждого из трех уровней концентраций (8,0, 20,0 и 50,0 мг/л для ХН и 0,50, 1,00 и 1,50 мг/л для ТБФ). Хроматограммы и масс-спектры указанного раствора и производственного образца иммуноглобулина «22s» приведены на рис. 1 и 2 соответственно. Статистическая обработка выполнена в программе Origin 8.2, значения *LOD* и *LOQ* рассчитаны из параметров градуировочных зависимостей согласно рекомендациям [13].

Правильность разработанной методики проверяли методом «введено – найдено» (табл. 3).

Таким образом, одновременное определение трибутилфосфата и холата натрия в образцах препаратов крови является компромиссом, при котором экспрессность и простота определения сопровождаются некоторым снижением точности и пределов обнаружения по сравнению с раздельным определением. Тем не менее методика обеспечивает достаточную чувствительность для решения поставленной аналитической задачи, а погрешность не превышает 11 % в изученных диапазонах концентраций ТБФ и ХН.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Зубкова Н. В.** Биотехнологические аспекты вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов: методология, производство, стандартизация. Автореф. дисс. ... докт. фарм. наук. — Пермь, 2012. — 47 с.
2. **Lin Y., Zhou J., Bi D., Chen P., Wang X., Liang S.** Sodium-deoxycholate-assisted tryptic digestion and identification of proteolytically resistant proteins /Anal. Biochem. 2008. Vol. 377. P. 259 – 266.
3. **Sharma K. R.** Review on bile acid analysis / Int. J. Pharm. Biomed. Sci. 2012. Vol. 3(2). P. 28 – 34.
4. **Nacher-Mestre J., Serrano R., Portoles T., Hernandez F.** Investigation of organophosphate esters in fresh water, salt and brine samples by GC-TOF MS / Anal. Methods. 2011. Vol. 3. P. 1779 – 1785.
5. **Ревельский А. И.** Методология анализа объектов различного происхождения методами газовой хроматографии-масс-спектрометрии и элементного анализа на содержание следов среднелетучих органических веществ. Автореф. дисс. ... докт. хим. наук. — М., 2012.
6. **Танюхина О. Н., Густылева Л. К., Корягина Н. Л. и др.** Исследование морской воды с применением классических методов растворной химии и метода газовой хроматографии — масс-спектрометрии / Тезис доклада «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». — Краснодар, 2010. С. 210.
7. Tributyl Phosphate: Method 5034, Issue 1. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). Fourth Edition, 1994. http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5034.pdf.
8. **Nuber R., Maucher H., Stange E. F.** Size exclusion chromatography for extraction of serum bile acids / J. Lipid Res. 1990. Vol. 31. P. 1517 – 1522.
9. **Locket P. L., Gallacher D. D.** An improved procedure for bile acid extraction and purification and tissue distribution in the rat / Lipids. 1989. Vol. 24. N 3. P. 221 – 223.
10. **Yamaga N., Ogura Y., Yamada K., et al.** Internal Standard Compounds for Quantitative Determination of Bile Acids by Gas Chromatography / Yonago Acta medica. 2001. Vol. 44. P. 91 – 105.
11. **Perwaiz S., Tuchweber B., Mignault D., et al.** Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry / J. Lipid Res. 2001. Vol. 42. N 1. P. 114 – 119.
12. **Mathapati S., Galla S., Sankaranarayanan K., et al.** Qualitative and quantitative detection of sodium deoxycholic acid in decellularized tissue / Indian J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2010. Vol. 26. P. 129 – 131.
13. ICH Q2B (R1). Validation of Analytical Procedure: Methodology. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1996. P. 11 – 12. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.