

**Б. Е. Толкачев<sup>1,2</sup>, А. М. Доценко<sup>1</sup>, А. О. Стрыгина<sup>2</sup>, О. В. Магницкая<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Волгоградский государственный медицинский университет,

<sup>2</sup> ГБУ Волгоградский медицинский научный центр,  
лаборатория клинической фармакологии

## **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАЛСАРТАНА И ГИДРОХЛОРОТИАЗИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

УДК 616.12-005.4-085.224

В рамках настоящего исследования была проведена разработка и валидация метода количественного определения валсартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека с помощью хромато-масс-спектрометрии. Использование масс-спектрометрического детектора позволило повысить селективность и чувствительность метода без использования трудоёмких методов пробоподготовки.

*Ключевые слова:* биоанализ, ВЭЖХ-МС/МС, валсартан, гидрохлоротиазид.

***B. E. Tolkachev, A. M. Docenko, A. O. Strygina, O. V. Magnitskaya***

## **QUANTITATIVE LC-MS/MS DETERMINATION OF VALSARTAN AND HYDROCHLOROTHIAZIDE IN HUMAN PLASMA**

Development and validation of the highly selective and sensitive LC-MS/MS method to detect valsartan and hydrochlorothiazide in human plasma were performed. Mass spectrometry detection made it possible to enhance analytical performance without time- and labor consuming sample preparation procedures, thus improving the overall bioanalytical productivity in the course of the bioequivalence study.

*Key words:* bioanalysis, LC-MS/MS, QTRAP, valsartan, hydrochlorothiazide.

Требования, предъявляемые к современным биоаналитическим исследованиям непрерывно повышаются, что подчёркивает важность разработки высокочувствительных и селективных методов, позволяющих проводить высокопроизводительный анализ биологических проб в рамках различных этапов изучения лекарственных средств, включая исследования биоэквивалентности [3].

### **ЦЕЛЬ РАБОТЫ**

Определение оптимальных условий одновременного количественного ВЭЖХ-МС/МС определения валсартана и гидрохлоротиазида в плазме крови для последующего использования в фармакокинетических исследованиях.

### **МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ**

Для приготовления маточных и стандартных растворов валсартана и гидрохлоротиазида использовались сухие навески соответствующих сертифицированных стандартов веществ, которые впоследствии растворяли и разводили в смеси ацетонитрил/вода в объёмном соотношении 80/20.

Для калибровки методики количественного определения была использована плазма крови добровольцев, не принимавших исследуемые препараты.

Калибровочные образцы готовились в диапазоне концентраций от 4 до 1 000 нг/мл для валсартана и от 0,5 до 250 нг для гидрохлоротиазида.

В качестве опытных образцов были использованы образцы плазмы крови здоровых добровольцев, принимавших комбинированный препарат в рамках проведения исследования биоэквивалентности.

Пробоподготовка калибровочных и опытных образцов плазмы крови проводилась методом преципитации белков путём добавления к 200 мкл каждой из проб 600 мкл ацетонитрила, последующим центрифугированием в течение 15 минут при 3 000 об./мин и отбором 100 мкл надосадочной жидкости для анализа.

Хроматографическое разделение компонентов проводилось с использованием ВЭЖХ системы Agilent 1260 с бинарным насосом и термостатируемым автосемплером на колонке Poroshell 120 C18 (4,6 x 50 мм, 2,7 мкм).

Для детекции аналитов использовалась гибридная масс-спектрометрическая система Sciex QTRAP 5500.

Регистрация хромато-масс-спектров проводилась с использованием программного обеспечения Analyst 1.6. Интеграция пиков, расчёт количественного содержания исследуемых соединений и статистическая обработка

данных проводилась с помощью программы MultiQuant 2.4.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка метода количественного ВЭЖХ-МС/МС определения валсартана и гидрохлоротиазида включала определения оптимальных параметров хроматографического разделения, а также последующей масс-спектрометрической детекции. В качестве метода ионизации был использован электроспрей (ESI). Детекция ионов проводилась в режиме отрицательной полярности [2].

Ионы-«предшественники» валсартана соответствовали частицам с  $m/z$  434,2, ионы-«предшественники» гидрохлоротиазида –  $m/z$  295,9. Для построения метода мониторинга множественных реакций (MRM) использовались ионные переходы, соответствующие наибольшей интенсивности ионов-«продуктов». Было установлено, что оба вещества в ходе диссоциации в камере соударений дают по два наиболее интенсивных

иона-«продукта»:  $m/z$  179,0 и  $m/z$  350,2 для валсартана;  $m/z$  268,9 и 204,9 для гидрохлоротиазида.

При создании количественного MRM-метода с целью повышения специфичности были использованы оба ионных перехода.

В ходе оптимизации условий хроматографического разделения был выбран изократический режим элюирования. Мобильная фаза представляла собой смесь ацетонитрил/вода в соотношении 80/20 при скорости потока 0,3 мл/мин. В качестве модификатора мобильной фазы использовался ацетат аммония в концентрации 10 мкмоль/л, добавляемый к водной составляющей мобильной фазы. Использование данного модификатора позволяет повысить степень ионизации изучаемых соединений, тем самым увеличивая чувствительность анализа (рис. 1).

При этих условиях время удерживания валсартана составило 1,43 мин, время удерживания гидрохлоротиазида – 1,69 мин, что позволяло сократить суммарное время анализа каждой пробы до 2,5 минут (рис. 2, 3).

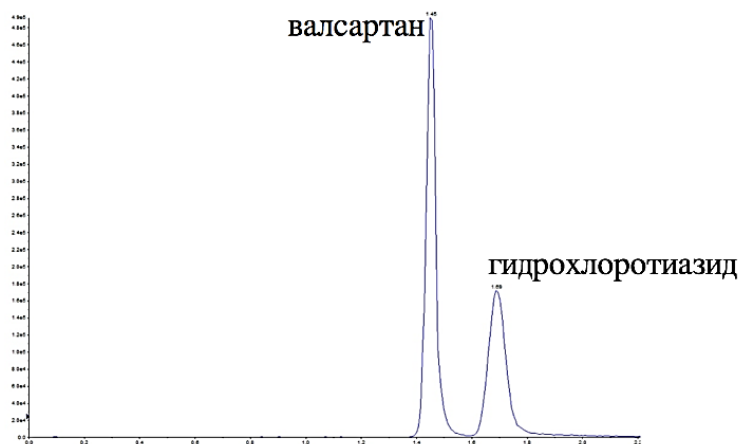


Рис. 1. Хромато-масс-спектрограмма опытного образца плазмы крови здорового добровольца после перорального приема комбинированного препарата «Валсартан-гидрохлоротиазид»: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала

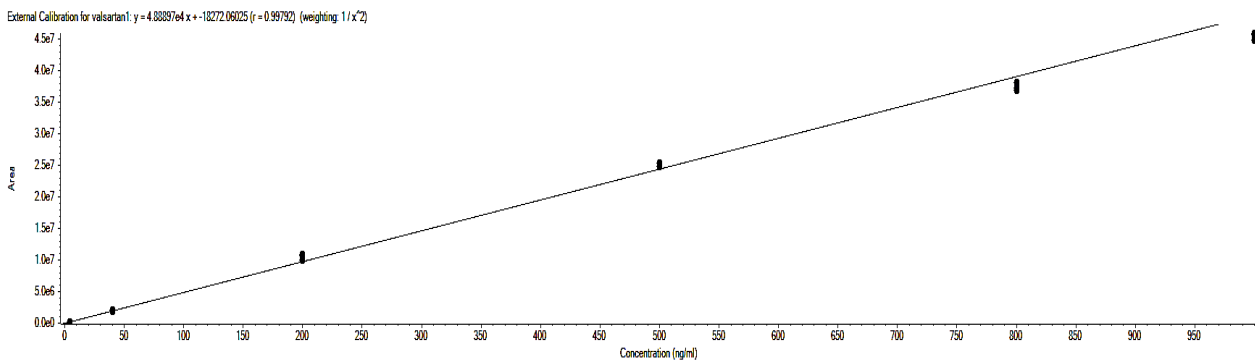


Рис. 2. Калибровочная кривая для валсартана: по оси ординат – площадь хромато-масс пика, нг/мл; по оси абсцисс – концентрация препарата

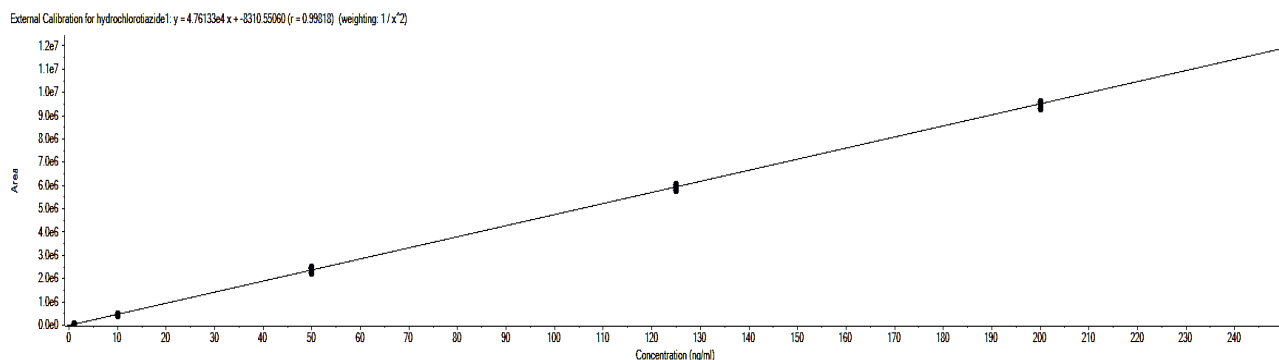


Рис. 3. Калибровочная кривая для гидрохлортиазида:  
по оси ординат – площадь хромато-масс пика, нг/мл; по оси абсцисс – концентрация препарата

В ходе валидации разработанного метода были установлены основные валидационные параметры: линейность, точность, правильность, чувствительность (нижний предел количественного определения), селективность.

Разработанная методика количественного определения подтвердила свою линейность в рассматриваемом диапазоне концентраций: при использовании взвешенного коэффициента  $1/x^2$  для обоих аналитов  $r^2 > 0,98$  (рис 4, 5).

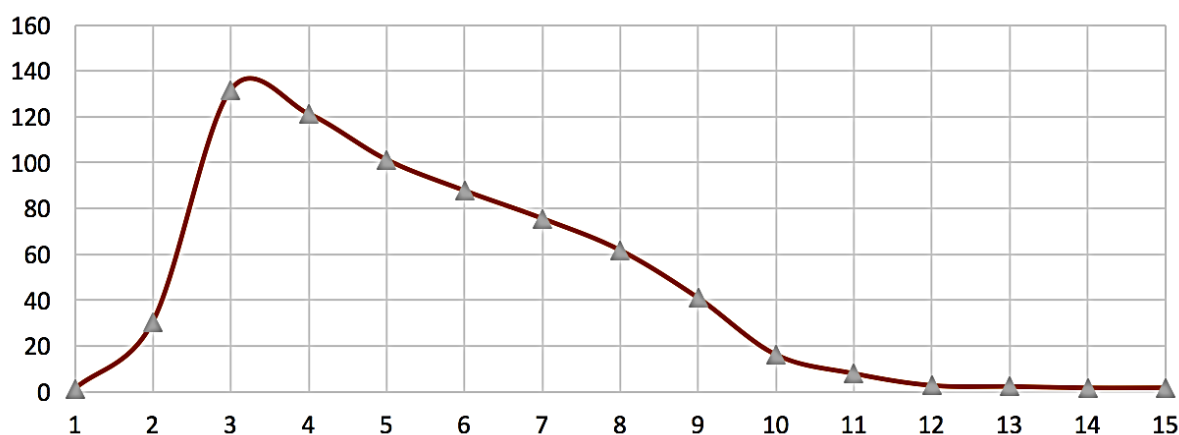


Рис 4. Фармакокинетическая кривая изменения концентрации валсартана после однократного перорального приёма комбинированного препарата «Валсартан/гидрохлортиазид»: по оси ординат – концентрация препарата, нг/мл; по оси абсцисс – порядковый номер пробы

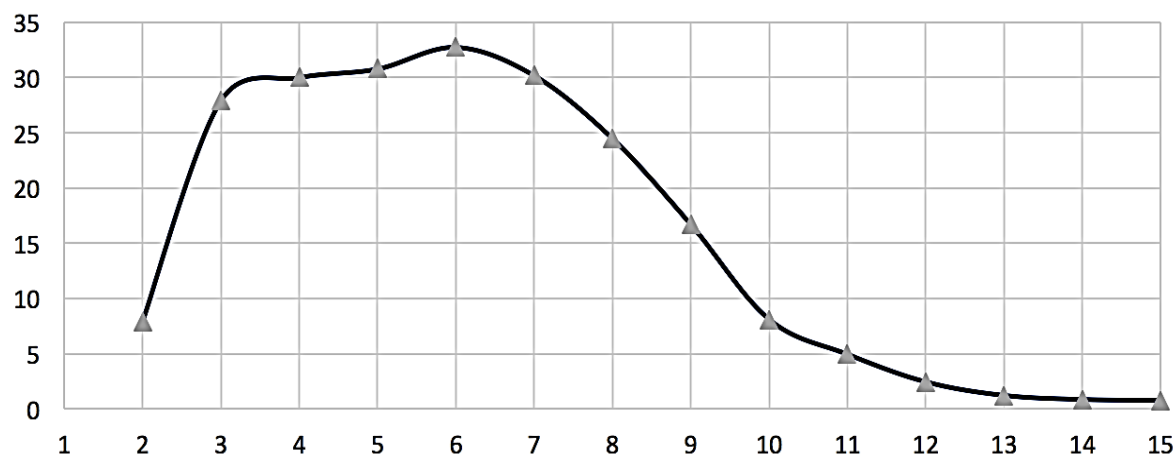


Рис. 5. Фармакокинетическая кривая изменения концентрации гидрохлортиазида после однократного перорального приёма комбинированного препарата «Валсартан/гидрохлортиазид»: по оси ординат – концентрация препарата, нг/мл; по оси абсцисс – порядковый номер пробы

Коэффициент вариации (%CV), рассчитываемый при определении меж- и внутрисуточных точности определения обоих препаратов не превышал 5 % для основного диапазона концентраций и 10 % для концентраций, соответствующих нижнему пределу количественного определения.

Отсутствие аналитической интерференции препаратов собой было достигнуто за счёт полного хроматографического разделения исследуемых веществ, а также использования несколько ионных MRM-переходов, обеспечивших высокую селективность биоанализа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведённого исследования были установлены оптимальные условия высокочувствительного и селективного количественного ВЭЖХ-МС/МС определения валсартана и гидрохлоротиазида в плазме

крови добровольцев, проведена его валидация и апробация в рамках биоаналитического этапа исследования биоэквивалентности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Особенности количественного определения аторвастатина в плазме крови пациентов с ишемической болезнью сердца / А. Ф. Рябуха, К. А. Кузнецов, О. В. Магницкая и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – № 1 (37). – С. 53–55.
2. A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of valsartan and hydrochlorothiazide in human plasma / H. Li, Y. Wang, Y. Jiang, et al. // J. Chromatogr B. – 2007. – № 852. – P. 436–442.
3. Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide and Valsartan in Human Plasma by Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry / F. Liu, J. Zhang, et al. // Analytical Letters. – 2008. – № 41 (8) – P. 1348–1365.

**О. Г. Струсовская<sup>1, 2</sup>, С. В. Поройский<sup>1, 3</sup>, И. В. Фирсова<sup>1</sup>, А. Г. Пампуха**

<sup>1</sup> Волгоградский государственный медицинский университет;

<sup>2</sup> ГБУ Волгоградский медицинский научный центр, научно-производственная лаборатория;

<sup>3</sup> ГБУ Волгоградский медицинский научный центр, лаборатория моделирования патологии

## ИССЛЕДОВАНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СТОМАТОЛОГИЧЕСКОГО ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ СУММЫ ХЛОРОФИЛЛОВ ИЗ ЛАМИНАРИИ САХАРИСТОЙ (*LAMINARIA SACCHARINA*, *LAMINARIACEAE* L.)

УДК 615.45

В статье приведены результаты определения реологических параметров стоматологического олеогеля на основе суммы хлорофиллов из ламинарии сахаристой. Установлено, что исследуемая фармацевтическая композиция обладает выраженными тиксотропными свойствами, коллоидной и термической стабильностью.

*Ключевые слова:* стоматологический гель, тиксотропность, пластичность, стабильность

**O. G. Strusovskaya, S. V. Poroyskiy, I. V. Firsova, A. G. Pampukha**

## INVESTIGATION OF RHEOLOGICAL PROPERTIES OF THE DENTAL CHLOROPHYLL-BASED GEL OBTAINED FROM KELP SUGARY (*LAMINARIA SACCHARINA*, *LAMINARIACEAE* L.)

The results of identifying rheological properties of the dental chlorophyll-based oleogel obtained from *Laminaria saccharina* are presented in the article. We found that the pharmaceutical agent showed pronounced thixotropic properties, thermal and colloidal stability.

*Key words:* dental gel, thixotropy, plasticity, stability.

Воспалительные заболевания пародонта и слизистых оболочек полости рта представляют серьезную проблему в современной стоматологии в связи со сложностью диагностики, терапии и реабилитации пациентов.

Ведущая роль в формировании воспалительного процесса в тканях пародонта принадлежит анаэробной флоре, а именно эндотоксинам пародонтопатогенных микроорганизмов [1].