



УДК 547.551:615.917:615.277.3:340.67

Применение методов обращено-фазовой хроматографии для идентификации и количественного определения флутамида и близких по структуре веществ в биологических жидкостях

Шорманов В.К.¹, Андреева Ю.В.¹, Герасимов Д.А.²,
Маркелов М.Ю.², Омельченко В.А.³

¹ГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», Курск

²ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора (Курский филиал), Курск

³ЭКЦ УМВД России по Орловской области, Орел

Поступила в редакцию 21.04.2016 г.

Исследованы особенности хроматографической активности флутамида и ряда близких по структуре соединений в тонких слоях и колонках обращеннофазовых сорбентов при использовании подвижных фаз на основе воды и буферных растворов с добавлением 20-80 % (по объёму) органических модификаторов. Рассчитаны параметры хроматографирования веществ рассматриваемой группы методами ТСХ, колоночной хроматографии низкого давления и ВЭЖХ. Разработана методика идентификации и количественного определения флутамида, его полупродукта синтеза и двух метаболитов в биологических жидкостях на основе применения методов обращеннофазовой хроматографии.

Ключевые слова: флутамид, полупродукты синтеза, метаболиты, ТСХ, колоночная хроматография, ВЭЖХ, биологические жидкости.

The use of reverse phase chromatography methods for the identification and quantification of flutamide and similar structures of substances in biological fluids

Shormanov V.K.¹, Andreeva Y.V.¹, Gerasimov D.A.²,
Markelov M.Yu.², Omelchenko V.A.³

¹Kursk State Medical University, Kursk

²FGBI «IMTSEUAOSMP» Roszdravnadzor, Kursk

³Forensic Science Center of the MOI of Russia for the Oryol region, Oryol

The object of the study was antitumor drug flutamide (2-methyl-N- (4-nitro-3- (trifluoromethyl) phenyl) propanamide) having significant toxicity and a number of structurally related compounds. As discussed TLC analytical methods, liquid chromatography, low pressure column and HPLC.

The features of the chromatographic activity flutamide, 4-nitro-3-trifluoromethylaniline, 2-methyl-N- (4-amino-3- (trifluoromethyl) phenyl) propanamide, and 2-methyl-N- (4-amino-3- (trifluoromethyl) phenyl) propanamide in thin layers and columns obraschënnofazovyh sorbents using mobile phases based on water and buffer solutions with addition of 20-80% (by volume) of organic modifiers. The parameters of this group of substances Chromatographic methods of TLC, column chromatography, HPLC and low pressure. Best mobile phases for thin layer chromatography in silica gel CTX-1A, modified with C14 to C15 alkanes, were water-acetonitrile (60:40) and 20 mM KH₂PO₄ buffer solution (pH 3.5) - acetonitrile (65:35) in the sorbent column «Silasorb C-18»- water - acetonitrile (40:60), column sorbent LiChrospher RP - 20 mM KH₂PO₄ solution (pH 5.3) - acetonitrile (65:35). A technique to identify and quantify flutamide, and its pre-

cursor the synthesis of two metabolites in biological fluids by applying reverse phase chromatography methods.

Keywords: flutamide, synthesis intermediates, metabolites, TLC, column chromatography, HPLC, biological fluid.

Введение

Флутамид (2-метил-N-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил)пропанами́д) – лекарственное средство, широко применяемое в медицине для лечения рака предстательной железы и гирсутизма у женщин [1].

Данное соединение обладает выраженными токсическими свойствами по отношению к теплокровным организмам. LD₅₀ флутамида для крыс составляет при пероральном введении 787 мг/кг, при внутрибрюшинном - 289 мг/кг. LC₅₀ у крыс, отравленных ингаляционно, превышает 0.25 мг/л. LD₅₀ флутамида для собак при пероральном введении составляет > 2000 мг/кг. Описаны случаи отравления людей флутамидом различной степени тяжести, в том числе с летальным исходом [2-4].

Полупродукт синтеза флутамида (4-нитро-3-трифторметиланилин) и отдельные продукты его биотрансформации (2-метил-N-(4-амино-3-(трифторметил)фенил)пропанами́д и N-(4-ацетаминo-3-(трифторметил)фенил)ацетамид) также как и флутамид являются биологически активными веществами с высокой степенью токсического действия на организм человека. Это характеризует флутамид и близкие к нему структуры как потенциальные объекты химико-токсикологического исследования.

Несмотря на очевидное химико-токсикологическое значение данной группы соединений многие вопросы их идентификации и определения в объектах биологического происхождения разработаны недостаточно [5-8].

В частности, недостаточно изучены возможности применения ряда хроматографических методов для целей очистки флутамида и близких по структуре соединений от эндогенных веществ биологических матриц, а также идентификации и оценки количественного содержания рассматриваемых соединений в извлечениях из биологических объектов животного происхождения.

Цель настоящего исследования – изучение особенностей идентификации и количественного определения флутамида и близких по структуре соединений методами обращеннофазовой хроматографии в биологических жидкостях.

Эксперимент

Исследованию подверглись флутамид - 2-метил-N-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил)пропанами́д (ФА) (LGC Standards, содержание вещества $\geq 99\%$), 4-нитро-3-(трифторметил)анилин (4-Н-3-ТФМА) (LGC Standards, содержание вещества $\geq 99\%$), 2-метил-N-(4-амино-3-(трифторметил)фенил)пропанами́д (2-М-N-4-А-3-ТФМФП) (PCO, содержание вещества $\geq 97\%$) и N-(4-ацетаминo-3-(трифторметил)фенил)ацетамид (N-4-АА-3-ТФМФАА) (PCO, содержание вещества $\geq 99\%$). В качестве внутреннего стандарта применялся анилин (А) (ГОСТ 5819-78, содержание вещества $\geq 99.5\%$).

В качестве аналитических методов рассматривались обращеннофазовые варианты тонкослойной хроматографии (ТСХ), жидкостной колоночной хроматографии низкого давления (ЖКХНД) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Исследовались особенности хроматографического поведения ФА и близких по структуре соединений в тонких слоях и колонках обращеннофазовых сорбентов

при использовании гидрофильных подвижных фаз. В подвижных фазах разбавителями являлась вода или буферные растворы, а модификаторами – метанол и ацетонитрил, наиболее часто используемые для хроматографирования в обращённых фазах. Преимуществом метанола является его относительно низкая вязкость, что обеспечивает более высокую скорость элюирования в тонких слоях и колонках сорбентов, а также достаточную эффективность разделения элюируемых зон. Очищенный ацетонитрил, также как и метанол, как самостоятельно, так и в виде смесей с водой хорошо пропускают излучение в ближнем ультрафиолете [9-11].

Оба растворителя по отношению к рассматриваемой группе аналитов обладают хорошей растворяющей способностью. При определении методом ТСХ применяли сорбент, представлявший собой силикагель (размер частиц 5 мкм), модифицированный алканами с длиной цепи C₁₄-C₁₅.

Модель тонкого слоя данного обращённофазового сорбента готовили путём обработки силикагеля СТХ-1А на стандартных пластинах «Сорбфил» марки ПТСХ-АФ-А-УФ 10%-ым раствором вазелинового масла в гексане с последующим высушиванием пластин на воздухе и удалением остатков вазелинового масла с тыльной стороны подложки.

Исследуемые вещества наносили на хроматографические пластины размером 10×5 см в виде 0.02% ацетоновых растворов (по 5-10 мкл). Хроматографировали восходящим методом в стеклянных камерах с внутренним объёмом около 600 см³. Камеры предварительно насыщали парами подвижной фазы в течение 30 минут. В качестве подвижных фаз рассмотрены вода и водные растворы различной реакции, а также их двухкомпонентные смеси с гидрофильными органическими растворителями (динамическими модификаторами).

Хроматограммы проявляли в УФ-свете. Рассчитывали значения абсолютной (Rf) и относительной (по отношению к анилину) (Rs) хроматографической подвижности, условное удерживание (В), коэффициент ёмкости (k'), число теоретических тарелок (N), высоту, эквивалентную теоретической тарелке (H), разрешающую способность (R) [12].

Строили графики зависимости значений хроматографической подвижности анализируемых веществ от процентного содержания динамического модификатора в двухкомпонентных подвижных фазах. При определении методом ЖКХНД использовали колонку с сорбентом Silasorb C₁₈ 30 мкм (общая масса сорбента 7.5 г). В колонку вводили по 2 см³ 0.25% растворов анализируемых веществ в элюентах. Элюат собирали в виде отдельных фракций по 2 см³.

Присутствие ФА и близких по структуре соединений во фракциях определяли после испарения из них элюента фотометрическим методом (растворяющая среда – этанол). Учитывая найденные объёмы удерживания (V_R) исследуемых веществ и объём удерживания неудерживаемого вещества (V₀), для каждого анализируемого соединения рассчитывали значения времени удерживания ($t_R = V_R/v$), коэффициента ёмкости ($k' = V_R - V_0 / V_0 = t_R - t_0 / t_0$), числа теоретических тарелок ($N = 16(t_R/\omega)^2$), где v – скорость истечения элюента (см³/мин), t_0 – время удерживания неудерживаемого вещества, ω – ширина пика у основания (мин) [13].

Определение методом ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе Waters 1525 с двухволновым UV- детектором Waters 2487 в колонке LiChrospher RP-18 (250×4.6 мм, размер частиц неподвижной фазы 5 мкм) фирмы «Merk» с предколонкой Agilent Zorbax C 18 SB (12.5×4.6 мм, размер частиц неподвижной фазы 5 мкм) фирмы «Merk» при температуре 20°C. Скорость подачи подвижной фазы составляла 1.0 см³/мин. Оптическую плотность ФА и близких по структуре соединений регистрировали при длине волн 300 нм. По известным формулам рассчитывали зна-

чения времени (t_R) и объема удерживания (V_R), коэффициента ёмкости (k'), числа теоретических тарелок (N) и коэффициента разделения (R_s) [9].

Для количественного определения ФА и близких по структуре соединений методом ВЭЖХ строили градуировочные графики, отражавшие прямо пропорциональную зависимость площади пика от количества хроматографируемого вещества и рассчитывали их уравнения.

Обсуждение результатов

Результаты хроматографирования ФА и близких по структуре соединений методом ТСХ при использовании однокомпонентных и двухкомпонентных подвижных фаз представлены в табл. 1.

Таблица 1. Подвижность флутамида (ФА) и близких по структуре соединений при хроматографировании в тонком слое сорбента с использованием однокомпонентных и двухкомпонентных подвижных фаз

Подвижная фаза	Содержание органического модификатора, об. %	А		ФА		4-НА-3-ТФМА		2-М-Н-4-А-3-ТФМФП		N-4-АА-3-ТФМФАА	
		Rf	Rf	Rs	Rf	Rs	Rf	Rs	Rf	Rs	
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	
Вода	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
Буферный раствор (рН=3.05)	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.06	0.00
Буферный раствор (рН=9.91)	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.08	0.00
Вода - метанол	80	0.84	0.59	0.70	0.85	1.01	0.86	1.02	0.75	0.89	
	65	0.74	0.50	0.68	0.73	0.99	0.75	1.01	0.72	0.97	
	60	0.62	0.44	0.71	0.64	1.03	0.65	1.05	0.70	1.13	
	50	0.51	0.34	0.67	0.59	1.16	0.62	1.22	0.69	1.35	
	40	0.47	0.13	0.28	0.40	0.85	0.44	0.94	0.59	1.26	
	35	0.38	0.09	0.24	0.28	0.74	0.32	0.84	0.48	1.26	
	20	0.28	0.00	0.00	0.09	0.32	0.14	0.50	0.35	1.25	
Буферный раствор (рН=3.05) – метанол	80	0.73	0.81	1.11	0.83	1.14	0.79	1.08	0.81	1.11	
	65	0.67	0.58	0.87	0.69	1.03	0.70	1.04	0.75	1.12	
	60	0.63	0.42	0.67	0.61	0.97	0.64	1.02	0.70	1.11	
	50	0.59	0.26	0.44	0.55	0.93	0.57	0.97	0.67	1.14	
	40	0.51	0.08	0.16	0.33	0.65	0.38	0.75	0.60	1.18	
	35	0.39	0.05	0.13	0.21	0.54	0.24	0.62	0.42	1.08	
	20	0.16	0.00	0.00	0.06	0.38	0.08	0.50	0.25	1.56	
Буферный раствор (рН=9.91) - метанол	80	0.72	0.71	0.99	0.73	1.01	0.69	0.96	0.78	1.08	
	65	0.63	0.59	0.94	0.70	1.11	0.67	1.06	0.76	1.21	
	60	0.54	0.40	0.74	0.69	1.28	0.65	1.20	0.74	1.37	
	50	0.48	0.28	0.58	0.66	1.38	0.63	1.31	0.71	1.45	
	40	0.46	0.08	0.17	0.34	0.74	0.36	0.78	0.58	1.26	
	35	0.42	0.04	0.09	0.23	0.55	0.25	0.60	0.48	1.14	
	20	0.37	0.00	0.00	0.07	0.19	0.12	0.32	0.37	1.00	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Вода –ацето- нитрил	80	0.96	0.92	0.96	0.83	0.86	0.91	0.95	0.97	1.01
	65	0.83	0.75	0.90	0.72	0.87	0.79	0.95	0.92	1.11
	60	0.78	0.62	0.79	0.68	0.87	0.76	0.97	0.88	1.13
	50	0.73	0.41	0.56	0.64	0.88	0.73	1.00	0.85	1.16
	40	0.70	0.22	0.31	0.59	0.84	0.68	0.97	0.79	1.13
	35	0.58	0.15	0.26	0.32	0.55	0.45	0.78	0.67	1.16
	20	0.34	0.00	0.00	0.07	0.21	0.14	0.41	0.53	1.56
Буферный раствор (рН=3.05) – ацето- нитрил	80	0.86	0.77	0.90	0.90	1.05	0.92	1.07	0.89	1.03
	65	0.84	0.67	0.80	0.79	0.94	0.81	0.96	0.83	0.99
	60	0.83	0.59	0.71	0.71	0.86	0.74	0.89	0.80	0.96
	50	0.80	0.50	0.63	0.65	0.81	0.71	0.89	0.78	0.98
	40	0.38	0.16	0.42	0.45	1.18	0.49	1.29	0.76	2.00
	35	0.21	0.10	0.48	0.31	1.48	0.36	1.71	0.63	3.00
	20	0.03	0.00	0.00	0.10	3.33	0.18	6.00	0.51	17.00
Буферный раствор (рН=9.91) – ацето- нитрил	80	0.70	0.73	1.04	0.75	1.07	0.85	1.21	0.79	1.12
	65	0.66	0.60	0.91	0.72	1.09	0.81	1.22	0.72	1.09
	60	0.64	0.52	0.81	0.69	1.07	0.79	1.23	0.69	1.07
	50	0.62	0.41	0.66	0.66	1.06	0.74	1.19	0.62	1.00
	40	0.51	0.31	0.60	0.48	0.94	0.68	1.33	0.60	1.17
	35	0.39	0.18	0.46	0.33	0.84	0.59	1.51	0.53	1.35
	20	0.18	0.00	0.00	0.15	0.83	0.48	2.66	0.45	2.50

Как свидетельствуют данные табл. 1, при использовании однокомпонентных подвижных фаз (воды или буферных растворов) значения R_f рассматриваемых веществ близки к нулю, что не позволяет разделить и идентифицировать ФА и близкие по структуре соединения при их совместном присутствии в анализируемой смеси.

В связи с этим была предпринята попытка оптимизации условий хроматографирования с целью увеличения хроматографической подвижности и достижения условий разделения исследуемых соединений путём применения двухкомпонентных элюентов. Как свидетельствуют полученные данные, для каждой группы подвижных фаз, являющихся смесями двух каких-либо растворителей, наблюдается зависимость хроматографической подвижности ФА и близких по структуре соединений в тонком слое силикагеля, модифицированного алканами (C_{14} - C_{15}), от процентного содержания динамического модификатора подвижной фазы: с увеличением содержания динамического модификатора величины R_f аналитов сначала резко возрастают, а затем, по достижению определённых значений, несколько стабилизируются.

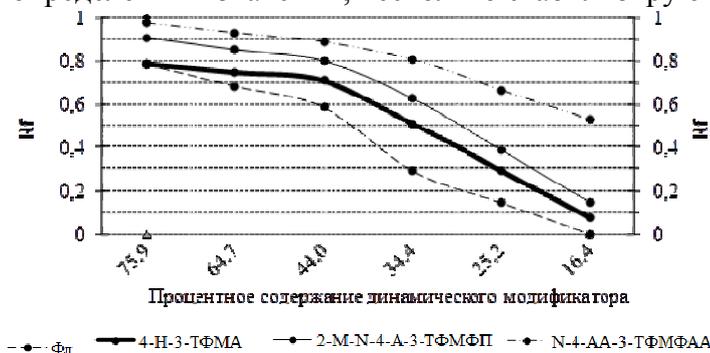


Рис. 1. Диаграммы хроматографирования производных 3-трифторметил-анилина с использованием подвижных фаз ацетонитрил-вода

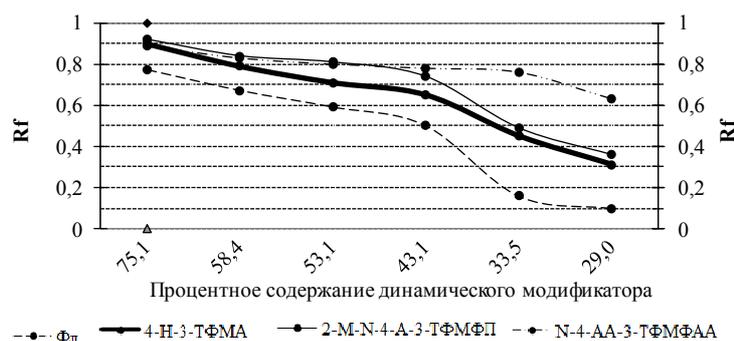


Рис. 2. Диаграммы хроматографирования производных 3- трифторметиланилина при использовании подвижных фаз буферный раствор (рН=3.05) – ацетонитрил

Наилучшего разделения всех анализируемых веществ на пластинах «Сорб-фил», модифицированных алканами (C₁₄-C₁₅), удаётся добиться, используя подвижные фазы вода-ацетонитрил (60:40) и 20 мМ буферный раствор КН₂РО₄ (рН 3.05) – ацетонитрил (65:35). Графики зависимости значений хроматографической подвижности анализируемых веществ от процентного содержания динамического модификатора в оптимальных подвижных фазах представлены на рис. 1 и 2. Параметры хроматографирования ФА и близких по структуре соединений при использовании данных подвижных фаз представлены в табл. 2.

Таблица 2. Параметры хроматографирования флутамида (ФА) и близких по структуре соединений в тонком слое сорбента при использовании оптимальных подвижных фаз

Объект исследования	Хроматографические параметры				
	В	k	N	H	R _s
Вода–ацетонитрил (60:40)					
А	1.40	0.40	676	0.011	3.00
ФА	4.54	3.54	1281	0.62	
4-Н-3-ТФМА	1.49	0.49	1798	0.004	
2-М-Н-4-А-3-ТФМФП	1.38	0.38	2540	0.03	
N-4-АА-3-ТФМФАА	1.25	0.25	278	0.028	
Буферный раствор (рН=3.05)–ацетонитрил (60:40)					
А	2.63	1.63	400	0.02	1.70
ФА	3.03	2.03	1866	0.44	
4-Н-3-ТФМА	2.22	1.22	342	0.02	
2-М-Н-4-А-3-ТФМФП	2.04	1.04	400	0.02	
N-4-АА-3-ТФМФАА	1.17	0.17	1819	0.004	

Примечание: при расчёте величины «Н» длина пробега фронта растворителя (L) и центра зоны вещества (l) измерялась в см.

Параметры хроматографирования ФА и близких по структуре соединений методом ЖКХНД с применением воды, ацетонитрила, а также смесей этих растворителей в различных объёмных соотношениях представлены в табл. 3.

Таблица 3. Параметры хроматографирования флуотида и близких по структуре соединений в колонке с сорбентом Silasorb C₁₈ 30 мкм с использованием различных элюентов, содержащих воду и ацетонитрил

Подвижные фазы (элюенты)	V _{о3} , см ³	v, см ³ /мин	ω, мин	V _{R3} , см ³	k'	t _R , мин	N
Флутид							
Вода-ацетонитрил (40:60)	5.9	0.82	2.68	17.7	2.00	21.58	1036
Вода-ацетонитрил (30:70)	5.7	0.67	3.28	14.5	1.54	21.64	695
Вода-ацетонитрил (20:80)	5.0	0.51	2.74	7.6	0.52	14.90	472
Ацетонитрил	7.0	1.81	0.72	8.7	0.21	4.80	717
4-(нитро)-3-(трифторметил)-анилин							
Вода-ацетонитрил (40:60)	6.6	1.04	3.84	12.6	0.90	12.11	159
Вода-ацетонитрил (45:55)	5.9	0.82	2.32	11.0	0.86	13.41	536
Вода-ацетонитрил (50:50)	5.7	0.67	4.92	20.4	2.58	30.44	611
Вода-ацетонитрил (20:80)	5.0	0.51	5.68	9.1	0.82	17.84	157
Ацетонитрил	7.0	1.81	1.65	8.0	0.14	4.42	114
2-метил-N-(4-амино-3-(трифторметил)фенил)пропанамид							
Вода-ацетонитрил (40:60)	6.6	1.04	3.75	14.7	1.22	14.13	227
Вода-ацетонитрил (45:55)	5.9	0.82	2.56	10.8	0.83	13.17	423
Вода-ацетонитрил (50:50)	5.7	0.67	4.77	20.5	2.59	30.60	657
Вода-ацетонитрил (20:80)	5.0	0.51	6.08	8.9	0.78	17.45	132
Ацетонитрил	7.0	1.81	1.60	8.1	0.15	4.47	125
N-(4-ацетамин-3-(трифторметил)фенил)ацетамид							
Вода-ацетонитрил (40:60)	6.6	1.04	3.75	14.7	1.22	14.13	227
Вода-ацетонитрил (45:55)	5.9	0.82	2.68	10.7	0.81	13.05	378
Вода-ацетонитрил (50:50)	5.7	0.67	4.77	20.5	2.69	30.60	657
Вода-ацетонитрил (20:80)	5.0	0.51	6.27	8.8	0.76	17.25	121
Ацетонитрил	7.0	1.81	1.60	8.1	0.15	4.47	125

Как свидетельствуют полученные данные, в качестве универсальной подвижной фазы, позволяющей достичь хороших результатов элюирования всех исследуемых веществ из колонки сорбента Silasorb C₁₈ 30 мкм, может быть применена смесь растворителей вода-ацетонитрил (40:60).

Она позволяет при относительно небольшом для ЖКХНД времени удерживания аналитов обеспечить их достаточно селективное элюирование как по отношению друг к другу, так и по отношению к группе гидрофильных соэкстрагирующихся веществ биоматериала, присутствующих в первых 6-8 см³ элюата.

Для хроматографирования ФА и близких по структуре соединений методом ВЭЖХ применяли подвижную фазу 20 мМ раствор КН₂РО₄ (рН 3.05) – ацетонитрил (65:35).

Параметры хроматографирования объектов исследования методом ВЭЖХ в колонке LiChrospher RP-18 (250×4.6 мм, размер частиц неподвижной фазы 5 мкм) фирмы «Merck» с использованием подвижной фазы 20 мМ раствор КН₂РО₄ (рН 3.05) – ацетонитрил (65:35) представлены в табл. 4.

Как свидетельствуют данные таблицы, выбранная хроматографическая система обеспечивает достаточную эффективность колонки по отношению к объектам исследования и позволяет разделить анализируемые объекты в случае их совместного присутствия в пробе.

Открываемый минимум ФА и близких по структуре соединений методом ВЭЖХ в предлагаемых условиях составляет $1 \cdot 10^{-8}$ – $1.5 \cdot 10^{-7}$ г в хроматографируемой пробе.

Таблица 4. Основные параметры хроматографирования флутамида (ФА) и близких по структуре соединений методом ВЭЖХ

Хроматографируемые вещества	t_R	V_R	k'	N	R_s
N-4-АА-3-ТФМФАА	3.76	376	0.38	463	3.82
4-Н-3-ТФМА	6.63	663	1.43	1101	0.06
2-М-Н-4-А-3-ТФМФП	6.67	667	1.44	1978	4.74
ФА	10.46	1046	2.83	1752	1.74
А	11.85	1185	3.34	6249	

Результаты, полученные при изучении хроматографических свойств ФА и близких по структуре соединений в тонких слоях и колонках обращённофазовых сорбентов, явились основой для разработки схем очистки, идентификации и количественного определения объектов исследования в биологических жидкостях с применением методов ЖКХНД, ТСХ и ВЭЖХ.

Методика определения флутамида и близких по структуре соединений в биологических жидкостях

При разработке методики готовили модельные смеси различных количеств анализируемых веществ (0.05-10.0 мг) с 25 г биологической жидкости (крови или плазмы крови), герметично закрывали и выдерживали при температуре 18-22°C в течение 1.5 часа.

По истечении указанного времени к 25 г модельной смеси, содержащей определённое количество того или иного анализируемого соединения, прибавляли 50 г ацетона и выдерживали 45 минут при периодическом перемешивании. Извлечение отделяли от частиц биоматериала декантацией, а операцию настаивания повторяли в вышеописанных условиях. Отдельные извлечения объединяли, фильтровали через стеклянный фильтр диаметром 3.6 см, предварительно промытый изолирующим агентом. Порции фильтрата и промывной жидкости объединяли и упаривали в токе воздуха при температуре 18-22°C до сухого остатка. Остаток растворяли в 2 см³ смеси растворителей вода-ацетонитрил (40:60) и вносили раствор в колонку с сорбентом Silasorb C₁₈ 30 мкм. После полного вхождения раствора в слой сорбента хроматографировали, используя элюент вода-ацетонитрил (40:60). Элюат собирали фракциями по 2 см³. Фракции, содержащие то или иное анализируемое вещество, объединяли, испаряли в токе воздуха при температуре 18-22°C. Остаток растворяли в 5 см³ ацетонитрила (исходный раствор).

Идентификация методом ТСХ. 0.3 см³ исходного раствора наносили на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил». Хроматографировали двукратно в присутствии вещества-свидетеля, используя подвижную фазу вода-ацетонитрил (60:40). Хроматограммы проявляли в УФ-свете. Исследуемые вещества идентифицировали по величине R_f. Открываемый минимум в 1 г биожидкостей составляет 0.3·10⁻⁶ г для флутамида, 0.3·10⁻⁶ для 4-Н-3-ТФМА, 0.8·10⁻⁶ для N-4-АА-3-ТФМФАА и 2.0·10⁻⁶ для 2-М-Н-4-А-3-ТФМФП.

Идентификация и количественное определение методом ВЭЖХ. 0.32-2.0 см³ исходного раствора вносили в мерную колбу вместимостью 10 см³, туда же прибавляли 1.5 см³ ацетонитрила, после чего доводили до метки 20 мМ раствором КН₂РО₄ (рН 3.05). 2-20 мкл полученного раствора вводили в хроматограф. Хроматографиро-

вали, используя подвижную фазу 20 мМ раствор KH_2PO_4 (рН 3.05) – ацетонитрил (65:35). Скорость подачи подвижной фазы - $1 \text{ см}^3/\text{мин}$. Оптическую плотность ФА и близких по структуре соединений регистрировали при 300 нм. Хроматограммы смеси стандартов анализируемых веществ, и этих же веществ, извлечённых из биожидкостей, представлены на рис. 3 и 4.

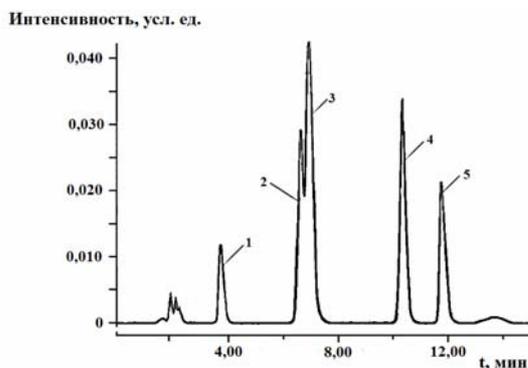


Рис. 3. Хроматограмма (ВЭЖХ) исследуемых соединений, извлечённых из крови: 1 - N-4-АА-3-ТФМФАА, 2 - 4-Н-3-ТФМА, 3 - 2-М-Н-4-А-3-ТФМФП, 4 - флутамид, 5 – анилин (хроматограф Waters 1525, подвижная фаза – 20 мМ раствор KH_2PO_4 (рН 3.05) – ацетонитрил (65:35))

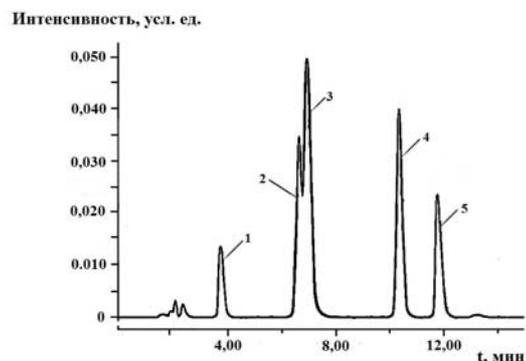


Рис. 4. Хроматограмма (ВЭЖХ) исследуемых соединений, извлечённых из плазмы: 1 - N-4-АА-3-ТФМФАА, 2 - 4-Н-3-ТФМА, 3 – 2-М-Н-4-А-3-ТФМФП, 4 - флутамид, 5 – анилин (хроматограф Waters 1525, подвижная фаза – 20 мМ раствор KH_2PO_4 (рН 3.05) – ацетонитрил (65:35))

Идентификацию веществ рассматриваемой группы осуществляли по значениям времени (объёма) их удерживания в колонке обращённофазового сорбента. Открываемый минимум в 1 г биожидкостей составляет $0.25 \cdot 10^{-6}$ г для флутамида, $0.25 \cdot 10^{-6}$ для 4-Н-3-ТФМА, $0.6 \cdot 10^{-6}$ для N-4-АА-3-ТФМФАА и $1.2 \cdot 10^{-6}$ для 2-М-Н-4-А-3-ТФМФП. Оценку количественного содержания проводили, исходя из площади хроматографического пика, используя соответствующие уравнения градуировочных графиков. Обнаруживается совпадение параметров, характеризующих хроматографическую активность и степень разделения анализируемых веществ методами ТСХ и ВЭЖХ с соответствующими параметрами веществ-стандартов. Проводили валидацию разработанной методики по параметрам линейности, селективности, правильности, прецизионности, устойчивости в соответствии с правилами FDA (Food and Drug Administration, USA) и EMA (European Medicines Agency) по валидации биоаналитических методик [14, 15].

Линейность. Градуировочные графики, отражающие линейную зависимость площади хроматографического пика (S , усл. ед.) от содержания анализируемого вещества в пробе (C , мкг/г), для определения рассматриваемых соединений методом ВЭЖХ в крови, описываются уравнениями: $S=103434 \cdot C+21384$, коэффициент корреляции $R^2=0.9998$ (для ФА), $S=47178 \cdot C+8236$, коэффициент корреляции $R^2=0.9999$ (для 4-НА-3-ТФМА), $S=19272 \cdot C-3045$, коэффициент корреляции $R^2=0.9998$ (для 2-М-Н-4-А-3-ТФМФП), $S=5487 \cdot C+1492$, коэффициент корреляции $R^2=0.9989$ (для N-4-АА-3-ТФМФАА); для определения в плазме: $S=105104 \cdot C+1849$, коэффициент корреляции $R^2=0.9997$ (для ФА), $S=53123 \cdot C+3125$, коэффициент корреляции $R^2=0.9999$ (для 4-НА-3-ТФМА), $S=20910 \cdot C-2619$, коэффициент корреляции $R^2=0.9999$ (для 2-М-Н-4-А-3-ТФМФП), $S=5606 \cdot C+981$, коэффициент корреляции $R^2=0.9998$ (для N-4-АА-3-ТФМФАА).

Селективность. По 6 чистых образцов каждой из биожидкостей и по 6 образцов биожидкостей, в каждый из которых добавляли стандартный раствор того или иного вещества в диапазоне концентраций $0.5 \cdot 10^{-6}$ – $1.0 \cdot 10^{-4}$ г/г (флутамид), $0.8 \cdot 10^{-6}$ – $1.6 \cdot 10^{-4}$ г/г (4-Н-3-ТФМА), $1.6 \cdot 10^{-6}$ – $2.0 \cdot 10^{-4}$ г/г (2-М-Н-4-А-3-ТФМФП), $0.8 \cdot 10^{-6}$ – $2.0 \cdot 10^{-4}$ г/г (N-4-АА-3-ТФМФАА). На хроматограммах образцов чистой крови и плазмы не наблюдалось пиков со значениями времени удерживания, соответствующими значениям времени удерживания аналитов.

Правильности и прецизионности. Анализировали по 3 образца каждой из биожидкостей, в которые вводили стандарты анализируемых соединений для создания концентраций, соответствующих началу, середине и концу зоны линейности. Каждый полученный раствор подвергали хроматографированию 5 раз. Исследование осуществляли в течение первого дня и последующего дня. Для найденных значений концентраций рассчитывали значения стандартного отклонения (S), относительного стандартного отклонения (S_r , %) и относительную погрешность (ϵ). Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты валидации разработанной методики по показателям правильности и прецизионности

Биологическая жидкость	Анализируемое вещество	Введено анализируемого вещества в биожидкость, г/г	Найдено							
			исследование в первый день				исследование в последующий день			
			\bar{x} (n=5), г/г	S	S_r , %	ϵ , %	\bar{x} (n=5), г/г	S	S_r , %	ϵ , %
Кровь	ФА	$0.5 \cdot 10^{-6}$	$0.485 \cdot 10^{-6}$	0.030	6.21	-3.00	$0.487 \cdot 10^{-6}$	0.028	5.82	-2.60
		$5.0 \cdot 10^{-6}$	$4.992 \cdot 10^{-6}$	0.221	4.42	-0.80	$5.101 \cdot 10^{-6}$	0.234	4.59	2.02
		$100.0 \cdot 10^{-6}$	$102.060 \cdot 10^{-6}$	2.655	2.60	2.06	$102.427 \cdot 10^{-6}$	2.777	2.71	2.43
	4-Н-3-ТФМА	$0.8 \cdot 10^{-6}$	$0.778 \cdot 10^{-6}$	0.046	5.92	-2.75	$0.788 \cdot 10^{-6}$	0.048	6.06	-1.45
		$10.0 \cdot 10^{-6}$	$9.955 \cdot 10^{-6}$	0.482	4.84	-0.45	$10.021 \cdot 10^{-6}$	0.462	4.61	0.21
		$160.0 \cdot 10^{-6}$	$164.281 \cdot 10^{-6}$	4.670	2.84	2.68	$163.827 \cdot 10^{-6}$	4.376	2.67	2.39
	2-М-Н-4-А-3-ТФМФП	$1.6 \cdot 10^{-6}$	$1.613 \cdot 10^{-6}$	0.110	6.82	0.78	$1.532 \cdot 10^{-6}$	0.102	6.68	-4.24
		$20.0 \cdot 10^{-6}$	$20.389 \cdot 10^{-6}$	1.035	5.03	1.95	$19.661 \cdot 10^{-6}$	0.930	4.73	-1.70
		$200.0 \cdot 10^{-6}$	$207.730 \cdot 10^{-6}$	5.603	2.70	3.87	$204.140 \cdot 10^{-6}$	5.251	2.57	2.07
	N-4-АА-3-ТФМФАА	$0.8 \cdot 10^{-6}$	$0.815 \cdot 10^{-6}$	0.053	6.55	1.88	$0.830 \cdot 10^{-6}$	0.051	6.19	3.70
		$10.0 \cdot 10^{-6}$	$9.872 \cdot 10^{-6}$	0.460	4.66	-1.28	$10.225 \cdot 10^{-6}$	0.482	4.71	2.25
		$200.0 \cdot 10^{-6}$	$204.224 \cdot 10^{-6}$	4.808	2.35	2.11	$201.552 \cdot 10^{-6}$	5.012	2.49	0.79
Плазма	ФА	$0.5 \cdot 10^{-6}$	$0.511 \cdot 10^{-6}$	0.028	5.47	2.28	$0.5102 \cdot 10^{-6}$	0.027	5.28	2.04
		$5.0 \cdot 10^{-6}$	$5.065 \cdot 10^{-6}$	0.201	3.96	1.29	$4.801 \cdot 10^{-6}$	0.173	3.60	-3.98
		$100.0 \cdot 10^{-6}$	$99.551 \cdot 10^{-6}$	1.915	1.92	-0.45	$100.665 \cdot 10^{-6}$	1.855	1.84	0.67
	4-Н-3-ТФМА	$0.8 \cdot 10^{-6}$	$0.788 \cdot 10^{-6}$	0.040	5.02	-1.53	$0.772 \cdot 10^{-6}$	0.037	4.80	-2.84
		$10.0 \cdot 10^{-6}$	$10.179 \cdot 10^{-6}$	0.384	3.77	1.79	$10.128 \cdot 10^{-6}$	0.391	3.86	1.28
		$160.0 \cdot 10^{-6}$	$163.813 \cdot 10^{-6}$	3.446	2.10	2.38	$162.821 \cdot 10^{-6}$	2.798	1.72	1.76
	2-М-Н-4-А-3-ТФМФП	$1.6 \cdot 10^{-6}$	$1.631 \cdot 10^{-6}$	0.091	5.59	1.91	$1.672 \cdot 10^{-6}$	0.091	5.42	4.50
		$20.0 \cdot 10^{-6}$	$19.421 \cdot 10^{-6}$	0.757	3.90	-2.90	$19.779 \cdot 10^{-6}$	0.796	4.02	-1.11
		$200.0 \cdot 10^{-6}$	$203.167 \cdot 10^{-6}$	4.414	2.17	1.58	$194.163 \cdot 10^{-6}$	4.511	2.32	-2.92
	N-4-АА-3-ТФМФАА	$0.8 \cdot 10^{-6}$	$0.826 \cdot 10^{-6}$	0.040	4.80	3.23	$0.822 \cdot 10^{-6}$	0.041	5.04	2.75
		$10.0 \cdot 10^{-6}$	$9.730 \cdot 10^{-6}$	0.380	3.91	-2.70	$9.675 \cdot 10^{-6}$	0.352	3.63	-3.25
		$200.0 \cdot 10^{-6}$	$203.338 \cdot 10^{-6}$	4.103	2.02	1.67	$204.279 \cdot 10^{-6}$	3.878	1.90	2.14

Стабильность. Определяли площади пиков анализируемых веществ при хроматографировании их стандартных растворов, сохраняющихся в течение двух недель при температуре 2–4°C. Кратковременную стабильность подготовленных проб, сохраняющихся 24 часов, доказывали, определяя площади пиков через сутки. Определение проводили на уровнях концентраций, соответствующих для каждого вещества

начальной и конечной концентрации участка линейной зависимости. Изменение площадей пиков во всех случаях не превышало 10 %.

Заключение

Проведено изучение характера хроматографической подвижности флутамида и трёх близких по структуре соединений при использовании обращено-фазовых вариантов ТСХ, колоночной хроматографии низкого давления и ВЭЖХ. Показано влияние на хроматографическую подвижность и особенности разделения данных соединений их химической структуры, природы подвижных фаз и концентрации в них динамического модификатора. Обоснована возможность применения методов обращено-фазовой хроматографии для очистки анализируемых соединений от эндогенных веществ биологических матриц, дальнейшей идентификации и оценки количественного содержания. На основе предварительных исследований разработана методика определения рассматриваемой группы аналитов в крови и плазме, которая по ряду основных валидационных характеристик удовлетворяют нормам, принятым для биоаналитических исследований. Минимальные обнаруживаемые количества флутамида и близких по структуре соединений в 1 г биожидкостей разработанной методикой составляют $(0.3-2.0) \cdot 10^{-6}$ г (для ТСХ) и $(0.25-1.2) \cdot 10^{-6}$ г (для ВЭЖХ).

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства, 16-е изд. М. Новая волна. 2012. 1216 с.
2. Lazaros G., Angelopoulou P., Chryssou S. // *Annals of gastroenterology*. 2001. Vol. 14. No 2. pp. 125-127.
3. Hung H.C., Lin I.H., Shiue K.F., Huang B.C. // *Journal Intern. Med. Taiwan* 2007. Vol. 18. pp. 35-39.
4. Bakdash A., Ganswindt M., Herre S. et al. // *Toxichem+Krimtech*. 2006. Vol. 73. No 2, pp. 61-65.
5. Шорманов В.К., Андреева Ю.В., Омельченко В.А. // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2014. Т. 57. № 5. С. 18-20.
6. Umrethia M.L., Ghosh P.K., Majithiya R.J., Murthy R.S.R. // *Ars Pharm*. 2005. Vol. 46. No 2, pp. 109-124.
7. Farthing D., Sica D., Fakhry I. et al. // *Biomedical Chromatography*. 1994. Vol. 8. No 5, pp. 251-254.
8. Jalalizadeh H., Soury E., Ghanami H.R.J. et al. // *International Journal of Pharmacology*. 2006. Vol. 2, pp. 221-225.
9. Стыскин М.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е. В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М. Химия. 1986. 288 с.
10. Рудаков О.Б. Растворитель как средство управления процессом в жидкостной хроматографии. Воронеж. РИЦ ЕФ ВГУ. 2003. 300 с.
11. Поспелова А.А., Карпова Л.Н., Малкова Т.Л. // *Токсикологический вестник*. 2012. № 2. С. 20-23.
12. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Углова В.З., Кулакова Н.В. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение. Саратов. Издательство Саратовского государственного университета. 2012. 128 с.
13. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. М. Мир. 1989. 399 с.
14. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office. Washington, DC, 2001, 22 p.
15. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London. 2009. 23 p.

References

1. Mashkovskij M.D. Lekarstvennye sredstva, M, Novaja volna Publ., 2012, 1216 p.
2. Lazaros G., Angelopoulou P., Chryssou S., Bourlis A., Anagnostopoulos G., Tassopoulos N.C., *Annals of gastroenterology*, 2001, Vol. 14, No 2, pp. 125-127.
3. Hung H.C., Lin I.H., Shiue K.F., Huang B.C., *Journal Intern. Med. Taiwan* 2007, Vol. 18, pp. 35-39.
4. Bakdash A., Ganswindt M., Herre S. et al., *Toxichem+Krimtech*, 2006, Vol. 73, No 2, pp. 61-65.
5. Shormanov V.K., Andreeva Ju.V., Omel'chenko V.A., *Sudebno-medicinskaja jekspertiza*, 2014, T. 57, No 5, pp. 18-20.
6. Umrethia M.L., Ghosh P.K., Majithiya R.J., Murthy R.S.R., *Ars Pharm*, 2005, Vol. 46, No 2, pp. 109-124.
7. Farthing D., Sica D., Fakhry I. et al., *Bio-medical Chromatography*, 1994, Vol. 8, No 5, pp. 251-254.
8. Jalalizadeh H., Soury E., Ghanami H.R.J. et al., *International Journal of Pharmacology*, 2006, Vol. 2, pp. 221-225.
9. Styskin E.L., Icykson L.B., Braude E.V. Prakticheskaja vysokoeffektivnaja zhidkostnaja hromatografija. M., Himija, 1986, 288 p.
10. Rudakov O.B. Rastvoritel' kak sredstvo upravlenija processom v zhidkostnoj hromatografii. Voronezh, RIC EF VGU, 2003, 300 p.
11. Pospelova A.A., Karpova L.N., Malkova T.L., *Toksikologicheskij vestnik*, 2012, No 2, pp. 20-23.
12. Sumina E.G., Shtykov S.N., Uglanova V.Z., Kulakova N.V. Tonkoslojnaja hromatografija. Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie. Saratov, Izdatel'stvo Saratovskogo gosudarstvennogo universiteta, 2012, 128 p.
13. Shunmakers P. Optimizacija selektivnosti v hromatografii. M., Mir, 1989, 399 p.
14. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office. Washington, DC, 2001, 22 p.
15. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London, 2009, 23 p.

Шорманов Владимир Камбулатович – д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского, Курск

Андреева Юлия Владимировна – аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск

Герасимов Дмитрий Александрович – к.фарм.н., ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора (Курский филиал), Курск

Маркелов Михаил Юрьевич – кандидат фармацевтических наук, ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора (Курский филиал), Курск

Омельченко Владимир Александрович – кандидат фармацевтических наук, начальник – полковник полиции ЭКЦ УМВД России по Орловской области г. Орел

Shormanov Vladimir K. – Doctor of pharmaceutical science, professor of department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: RWLADIMIR@yandex.ru

Andreeva Julia V. – Postgraduate student of department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: dzhulia.andreeva2012@yandex.ru

Gerasimov Dmitriy A. - Candidate of pharmaceutical science, FGBI "IMTSEUAOSMP" Roszdravnadzor, Kursk

Markelov Mihail Yu. - Candidate of pharmaceutical science, FGBI "IMTSEUAOSMP" Roszdravnadzor, Kursk

Omelchenko Vladimir A. - Candidate of pharmaceutical science, chief - colonel of Police Forensic Science Center of the MOI of Russia Orel, Orel