

На правах рукописи



КРИВОЩЕКОВ Сергей Владимирович

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В КРОВИ МЕТОДОМ
ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск – 2018

Работа выполнена на базе Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ФГАОУ ВО НИ ТПУ).

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Юсубов Мехман Сулейман оглы

Официальные оппоненты: Зибарева Лариса Николаевна
доктор химических наук,
Национальный исследовательский
Томский государственный университет,
Сибирский ботанический сад,
старший научный сотрудник

Нехорошев Сергей Викторович
доктор технических наук,
Ханты-Мансийская государственная
медицинская академия,
главный научный сотрудник

Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет

Защита состоится «17» декабря 2018 г. в 17⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.269.04 в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 43а, 2 корпус ТПУ, Малая химическая аудитория.

С диссертационной работой можно ознакомиться в Научно-технической библиотеке ФГАОУ ВО НИ ТПУ по адресу: 634034, г. Томск, ул. Белинского, 53а. и на сайте [http:// portal.tpu.ru:7777/council/911/worklist](http://portal.tpu.ru:7777/council/911/worklist)

Автореферат разослан «___» октября 2018 г.

И.о. ученого секретаря
диссертационного совета
Д.212.269.04



Г.Б. Слепченко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Гексафторид серы (ГС) – высший фторид серы(VI), применяемый во многих областях народного хозяйства. В том числе, на сегодняшний день известен ряд фармацевтических препаратов на его основе, например Sonovue (Bracco, Италия), применяемых в ультразвуковых исследованиях. Группой ученых ТПУ и СибГМУ в 2016 году разработан первый отечественный препарат на основе ГС для ультразвуковой визуализации очаговых воспалительных процессов и проведены его доклинические исследования.

На этапе доклинических исследований, должна быть оценена фармакокинетика лекарственного средства (ЛС) на опытных животных. Определение фармакокинетических (ФК) параметров основывается на определении изменения содержания действующего вещества в организме экспериментальных животных в зависимости от времени, и чем достовернее будет проводиться это определение, тем качественней можно будет экстраполировать исследование препарата на человека. Таким образом, первоочередная задача ФК исследований нового препарата на основе ГС сводится к разработке метода (методики) количественного определения действующего вещества – гексафторида серы.

Несмотря на многообразие описанных в литературе хроматографических методик определения ГС, в настоящее время отсутствует экспрессный, не трудоемкий и не требующий дополнительного вспомогательного оборудования хромато-масс-спектрометрический (ГХ-МС) метод определения ГС в биологических средах (кровь).

Таким образом, актуальной задачей является разработка высокочувствительной и селективной методики определения гексафторида серы методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в образцах со сложной биологической матрицей (кровь).

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось изучение закономерностей аналитического сигнала гексафторида серы в условиях хромато-

масс-спектрометрического определения с использованием капиллярных колонок и разработка метода количественного определения гексафторида серы в крови.

Для достижения цели, были поставлены следующие задачи:

1. Изучить хроматографическое поведение ГС с использованием капиллярных колонок и подобрать рабочие условия элюирования.
2. Изучить основные факторы масс-спектрометрического детектирования при определении ГС методом хромато-масс-спектрометрии.
3. Изучить параметры экстракции ГС из крови для его последующего хроматографического определения и разработать алгоритм пробоподготовки.
4. Разработать методику количественного химического анализа цельной крови при определении ГС методом хромато-масс-спектрометрии и рассчитать основные ее метрологические характеристики.
5. Провести апробацию методики количественного определения гексафторида серы методом хромато-масс-спектрометрии в эксперименте на животных.

Научная новизна.

Впервые установлены закономерности влияния температуры источника ионов масс-спектрометрического детектора и режима сканирования ионов на аналитический сигнал гексафторида серы.

Впервые изучена возможность применения гептана для жидкость-жидкостной экстракции ГС из образцов крови при пробоподготовке для газохроматографического анализа.

Впервые применен подход жидкость-жидкостной экстракции ГС из образцов крови, на основе которого разработан алгоритм пробоподготовки образцов крови для дальнейшего газохроматографического определения ГС.

Впервые предложена газохроматографическая методика определения ГС в крови и определены ее метрологические характеристики.

Впервые с использованием разработанной газохроматографической методики определены фармакокинетические параметры нового УЗИ-контрастного препарата.

Практическая значимость.

Разработана экспрессная хроматографическая методика количественного определения гексафторида серы в крови. Выбранные условия анализа крови при определении гексафторида серы нивелируют матричный эффект. Разработанная методика расширяет арсенал методов изучения фармакокинетики лекарственных средств на основе ГС. Определены метрологические характеристики, которые соответствуют предъявляемым к биоаналитическим методикам требованиям. Проведена метрологическая экспертиза методики количественного определения гексафторида серы ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России и рекомендована к аттестации.

Методика внедрена в практику работы НИИФиРМ им. Гольдберга и Центра внедрения технологий СибГМУ для изучения фармакокинетических параметров лекарственных средств на основе ГС.

С помощью разработанной методики проведено изучение фармакокинетики ЛС на основе гексафторида серы, произведенного в Центра внедрения технологий СибГМУ, в рамках доклинических исследований, поддержанных грантом Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (Государственный контракт от «17» марта 2014 г. № 14.N08.12.0027). Полученные с использованием разработанной методики результаты, позволили рассчитать фармакокинетические параметры ЛС в эксперименте на различных видах животных.

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты изучения хроматографического поведения и влияния параметров МС-детектора на аналитический сигнал гексафторида серы.
2. Рабочие условия ГХ-МС системы для количественного определения ГС.
3. Алгоритм методики анализа образцов крови с применением жидкость-жидкостной экстракции на этапе пробоподготовки.
4. Методика определения гексафторида серы в образцах крови методом ГХ-МС и результаты ее метрологической оценки.

5. Результаты анализа образцов крови экспериментальных животных при определении фармакокинетики нового контрастного препарата.

Апробация результатов исследования. Основные результаты исследования легли в основу 7 работ, в том числе 4 статьи в журналах из перечня ВАК (из них 2 статьи переведены на английский язык), 1 патент Российской Федерации и 2 доклада и тезиса докладов на международных и всероссийских конференциях. Проведена метрологическая экспертиза методики количественного определения гексафторида серы ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России и рекомендована к аттестации

Личный вклад автора состоит из планирования экспериментальной работы, получении хроматографических данных, их обработке и систематизации, а также в обобщении и обсуждении результатов работы.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 118 страницах машинописного текста, содержит 37 таблиц и 29 рисунков; состоит из введения, пяти глав, заключения и выводов, списка использованных литературных источников, включающего 109 наименований, 2 приложений.

Основное содержание работы

Во введении отражена актуальность исследования, сформулированы цели и задачи. В **первой главе** представлен обзор литературы по физико-химическим свойствам, нормативам содержания и областям применения ГС, методам его количественного определения в различных объектах, методам пробоподготовки образцов крови и особенностям газохроматографического анализа. Также приведены мировые тенденции при анализе образцов со сложной матрицей. На основании проведенного литературного обзора сформулированы цели и задачи исследования. Во **второй главе** приводится описание методик проведения эксперимента, характеристика реактивов и аппаратуры, способа приготовления раствора гексафторида серы, а также изучена его стабильность. **Третья глава** посвящена изучению хроматографического поведения ГС и параметров его детектирования. Также дано обоснование выбора внутреннего стандарта.

Приведены результаты определения рабочих условий экстракции ГС из образцов крови и изучения стабильности рабочих градуировочных и экспериментальных образцов. Также оценено влияние матичного эффекта на получаемый результат в разработанных условиях проведения анализа. В **четвертой главе** представлены метрологические характеристики хромато-масс-спектрометрической методики определения гексафторида серы в крови. В **пятой главе** представлены результаты апробации методики определения ГС в крови экспериментальных животных при изучении фармакокинетики лекарственного средства на основе ГС. На основании полученных результатов сделаны выводы и обобщающее заключение.

Результаты и обсуждение.

Изучение параметров удерживания ГС проведены в изотермическом режиме хроматографирования: подвижная фаза – гелий, объемная скорость 1 мл/мин; неподвижная фаза: HP-1MS - 100%-метил-полисилоксановая фаза 0,25 мкм; HP-5MS - 5%-фенил-95%-метил-полисилоксановая фаза 0,25 мкм; HP-INNOWAX – полиэтиленгликоль 1 мкм. В эксперименте показано незначительное удерживание ГС на капиллярных колонках с нанесенной неполярной фазой (HP-1ms, HP-5ms) при температуре выше комнатной, также отсутствие сорбции на сильнополярной колонке HP-INNOWAX. Поэтому рабочими условиями хроматографирования ГС принята температура термостата колонок 40 °С, обеспечивающая минимальное время анализа при сохранении удерживания ГС. Как отмечается производителем, колонки HP-5ms обладают меньшей стабильностью по сравнению с HP-1ms, поэтому предложено в дальнейшей работе использовать именно последние.

Для определения ГС в крови выбран режим мониторинга выделенных ионов (SIM), который, как следует из литературных источников, имеет преимущество перед режимом полного ионного тока (SCAN) заключающееся в снижении предела обнаружения галогенсодержащих аналитов в 2-20 раз, что является определяющим фактором при анализе микроколичеств вещества. Из простоты строения молекулы в спектре электронной ионизации ГС присутствует фрагментация по типу $[M-nF]^+$, наиболее интенсивный сигнал (ион с 127 m/z),

соответствующий фрагменту $[\text{SF}_5]^+$, был выбран для режима мониторинга выделенных ионов.

Изучение влияния температуры источника ионов (ИИ) на интенсивность сигнала ГС в режимах SCAN и SIM по иону 127 m/z показало (рисунки 1 и 2), что увеличение температуры ИИ со 100 до 200 °С, приводит к увеличению общего тока (примерно на 4,5 %), однако, относительная интенсивность иона 127 m/z снижается на 13 %. Причем, дальнейшее увеличение температуры ИИ (до 250 °С) приводит к еще большему снижению интенсивности сигнала ГС в режиме селективного ионного мониторинга.

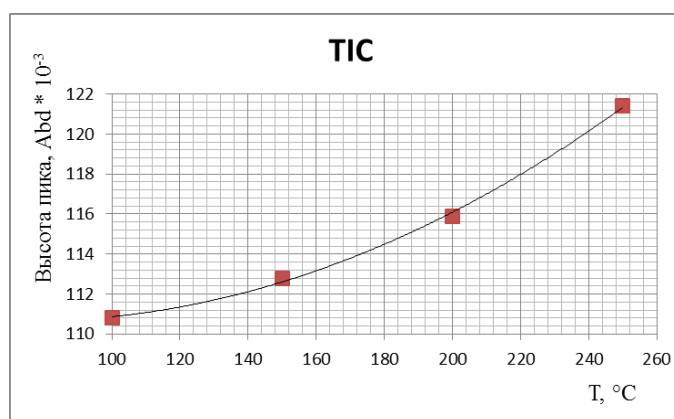


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности сигнала ГС в режиме SCAN от температуры источника ионов $c(\text{SF}_6) = 1 \text{ мкмоль/дм}^3$.

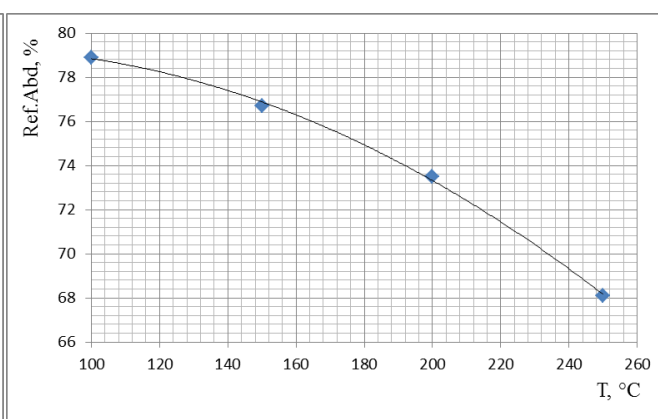


Рисунок 2 – Зависимость относительной интенсивности иона 127 m/z от температуры источника ионов

Как следствие из этого, предел обнаружения и предел количественного определения в режиме SIM увеличиваются при росте температуры источника ионов, что является негативным фактором для аналитиков. Таким образом, нами экспериментально отработаны условия масс-спектрометрического детектирования ГС, обеспечивающее наибольшую чувствительность – температура источника ионов 100 °С, режим селективного ионного мониторинга по иону 127 m/z.

В связи со структурными особенностями молекулы аналита подобрать внутренний стандарт (ВС) из гомологического ряда, либо изотопно-меченный, удовлетворяющий всем требованиям, затруднительно. Примененный нами, при

использовании ДЭЗ, тетрахлорметан (как и другие галогенсодержащие вещества), показал свою непригодность при масс-спектрометрическом детектировании: большая ширина пика и низкий отклик детектора не позволяют проводить правильное интегрирование сигнала внутреннего стандарта. Поэтому, из числа органических веществ, СТХ которых производятся в России, что делает их коммерчески доступными для использования в большинстве лабораторий, в качестве ВС нами был выбран толуол (с концентрацией 5 мкмоль/дм³). Данное вещество, наряду с другими, имеет ряд преимуществ: меньшее время удерживания в условиях проведения анализа (по сравнению с другими СТХ); высокая чувствительность МС детектора и низкая растворимость в воде.

Выбор экстрагента ГС из биологической матрицы основывается на общепринятых требованиях – низкая растворимость в воде, хорошая растворимость ГС в растворителе и относительно низкая летучесть ($T_{\text{кип}} > 60^{\circ}\text{C}$). Наиболее подходящими на роль экстрагента являются циклогексан ($T_{\text{кип}} = 80,74^{\circ}\text{C}$; 5,5 мг/100 мл) и гептан ($T_{\text{кип}} = 98,42^{\circ}\text{C}$; 0,3 мг/ 100 мл).

Опытные образцы крови с добавкой ГС (1,0 мкмоль/дм³) подготовлены путем добавления известного количества лекарственного средства на основе ГС и проэкстрагированы равным объемом растворителя. В качестве метода сравнения использован подход с термической экстракцией ГС (поглощение ГС, выделяющегося при нагревании образца крови в течение 2 минут). Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика степени извлечения ГС из образцов крови экстракционным и термическим способами ($n = 6$, $p = 0,95$).

Способ извлечения ГС	Введено, мкмоль/дм ³	Найдено, мкмоль/дм ³	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %
Циклогексан	1,0	0,61±0,06	61	9,4
Гептан		0,59±0,03	59	5,5
Термический 100 °С		0,68±0,04	68	5,6
Термический 300 °С		0,96±0,05	96	4,9

Из приведенных данных, экстракционный способ извлечения аналита, аналогичный, описанному в предыдущих работах, из образца в 1,6 раза менее эффективен по сравнению с термическим, т.е. влияние матричного эффекта велико, однако трудозатраты термического способа извлечения не позволяют предложить его в качестве рабочего метода пробоподготовки при потоковых анализах. Значительное увеличение коэффициента вариации при экстракции циклогексаном можно объяснить его большей летучестью, по сравнению с гептаном, и как следствие изменением концентрации аналита и ВС. Поэтому в дальнейшей работе по оптимизации жидкость-жидкостной экстракции гексафторида серы использован гептан.

Для нивелирования матричного эффекта при экстракции ГС гептаном изучено влияние высаливающих и денатурирующих агентов, в качестве которых использованы NaCl (1 моль/дм³), трихлоруксусная кислота (30 %) и Al₂(SO₄)₃ (1 моль/дм³) (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние высаливающих агентов на степень извлечения ГС из образцов крови (n = 6, p= 0,95).

Высаливающий агент	Введено, мкмоль/дм ³	Найдено, мкмоль/дм ³	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %
Гептан	1,0	0,59±0,03	59	5,0
Гептан+NaCl		0,61±0,03	61	5,3
Гептан+NaCl+ТХУ		0,63±0,03	63	5,0
Гептан+ТХУ		0,55±0,03	55	5,2
Гептан+ТХУ+Al ₂ (SO ₄) ₃		0,78±0,04	78	4,9
Гептан+Al ₂ (SO ₄) ₃		0,81±0,04	81	4,7

Незначительное влияние ТХУ и хлорида натрия, которые увеличивают извлекаемое количество ГС менее чем на 10 % (при совместном применении) может свидетельствовать о том, что ГС связан не с белками крови, а находится с гидрофобными молекулами, возможно, в виде мицелл. Что косвенно подтверждается значительным увеличением степени извлечения ГС из образцов

крови под действием сульфата алюминия, которое можно объяснить его коагулирующим действием, и, большим влиянием на разрушение мицелл, заключающих в себе ГС.

Для повышения интенсивности процесса извлечения ГС из образцов крови гептаном изучена возможность применения лабораторного смесителя типа «вортекс», результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние времени вортексирования на степень извлечения ГС из образцов крови (n=6, p= 0.95)

Объем гептана, мл	Введено, мкмоль/дм ³	Объем пробы, мл	Длительность вортексирования, сек	Найдено, мкмоль/дм ³	Степень извлечения, %
0,5	1,0	0,5	0	0,59±0,03	59
			10	0,75±0,04	75
			20	0,88±0,05	88
			30	0,85±0,04	85

Показано, что время вортексирования (в исследуемых значениях) является важным параметром пробоподготовки образцов крови, т.к. десятисекундное вортексирование приводит к увеличению степени извлечения более чем на 20 %, по сравнению с обычным перемешиванием. И при увеличении времени воздействия до 20 секунд достигается максимальная степень извлечения гексафторида серы из образца крови, которая превышает таковую при использовании сульфата алюминия. Таким образом, рабочими условиями вортексирования при пробоподготовке являются – максимальная скорость (2000 об./мин) и время 20 секунд, которые обеспечивают простоту и экспрессность анализа без использования дополнительных реагентов.

На следующем этапе разработки методики пробоподготовки образцов крови определено влияние соотношения «гептан : образец крови» (длительность вортексирования – 20 сек) на степень извлечения ГС (рисунок 3).

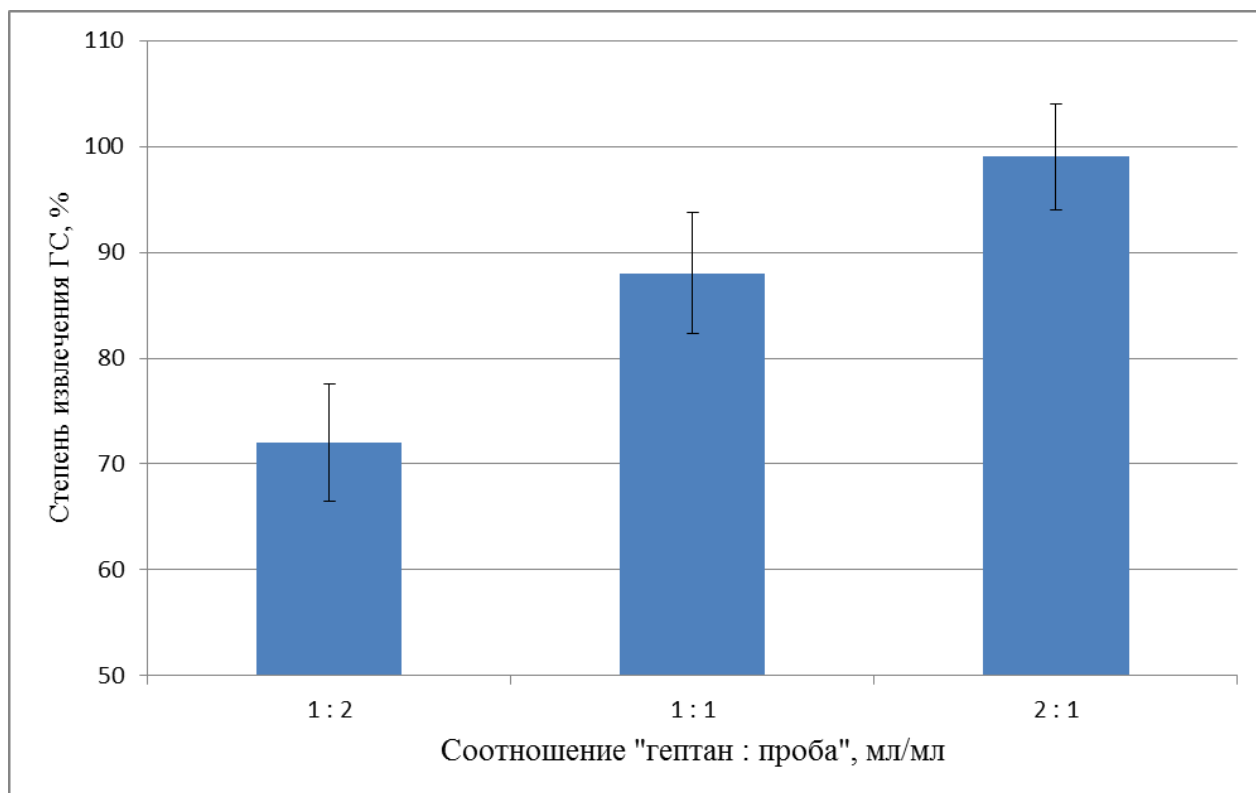


Рисунок 3 – Влияние соотношения «гептан : образец крови» на степень извлечения ГС из образцов крови (n=6, p= 0,95)

Из проведенного эксперимента следует, что степень извлечение ГС из образца крови увеличивается при увеличении соотношения «гептан : образец крови» и достигает 99 % при значении 2:1.

Таким образом, нами были подобраны рабочие условия извлечения ГС из образцов крови, обеспечивающее степень извлечения ГС 99 %.

Для оценки **стабильности** (в условиях автосемплера) **градуировочных растворов ГС** (в диапазоне 0,1 – 15 мкмоль/дм³) в гептане после приготовления методом последовательного разбавления, из каждого раствора отбирали пробы через 1; 2; 4; 6; 8 и 10 часов и определяли величину сигнала ($\frac{S(SF_6)}{S(C_6H_5CH_3)}$) (таблица 4).

Таблица 4 – Результаты изучения стабильности градуировочных растворов ГС (n=6, p=0,95)

		$\frac{S(SF_6)}{S(C_6H_5CH_3)}$						
t, ч		0	1	2	4	6	8	10
Концентрация ГС, мкмоль/дм ³	0,5	0,36±0,02	0,35±0,02	0,36±0,02	0,35±0,02	0,35±0,02	0,35±0,02	0,36±0,02
	1	0,75±0,03	0,75±0,04	0,72±0,04	0,74±0,04	0,76±0,04	0,74±0,04	0,73±0,04
	5	3,91±0,18	3,96±0,17	3,90±0,19	3,84±0,18	3,90±0,18	3,79±0,20	3,88±0,19
	10	7,9±0,4	7,7±0,4	7,9±0,4	7,9±0,4	8,2±0,4	7,7±0,4	7,6±0,4
	15	11,8±0,6	11,4±0,6	11,5±0,6	11,9±0,6	11,7±0,6	12,1±0,6	11,7±0,6

Несмотря на то, что насыщенный раствор ГС в течение первых 30 минут после приготовления теряет 1 % гексафторида, приготовленные на его основе градуировочные растворы (в диапазоне концентраций 0,5 – 15 мкмоль/дм³) в условиях автосемплера хроматографа сохраняют стабильность на протяжении 10 часов.

Кратковременная **стабильность образцов крови** была изучена при их хранении в течение 24 часов при комнатной температуре, +2 - +8 °С и при –40 °С в плотно закрытых пробирках. Для исследования брали 2 уровня концентраций ГС: 0,1 мкмоль/дм³ и 1,0 мкмоль/дм³. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты исследования кратковременной стабильности образцов крови (n=6, p=0,95)

Условия хранения образцов	Значение найденной концентрации ГС, мкмоль/дм ³			
	4 ч	8 ч	12 ч	24 ч
Уровень концентрации	0,1 мкмоль/дм ³			
Комнатная температура	0,095±0,007	0,089±0,006	0,081±0,006	0,072±0,005
Холодильник +2 - +8 °С	0,097±0,006	0,092±0,006	0,088±0,005	0,081±0,006
Морозильная камера –40 °С	0,096±0,007	0,094±0,006	0,095±0,006	0,095±0,005
Уровень концентрации	1,0 мкмоль/дм ³			
Комнатная температура	0,97±0,05	0,93±0,04	0,89±0,04	0,79±0,04
Холодильник +2 - +8 °С	0,98±0,05	0,93±0,04	0,90±0,04	0,85±0,04
Морозильная камера –40 °С	0,96±0,05	0,95±0,05	0,96±0,04	0,97±0,04

Стабильность оценивали по степени деградации, которая для образца с концентрацией $0,1 \text{ мкмоль/дм}^3$ при комнатной температуре и в условиях холодильника составила 28 % и 19 %, соответственно. Для 2 уровня концентрации ($1,0 \text{ мкмоль/дм}^3$) содержание ГС снизилось в течение 24 часов в условиях комнатной температуры и холодильника на 21 % и 15 %, соответственно. При этом достоверного снижения содержания ГС при хранении в морозильной камере не отмечалось на обоих уровнях концентрации.

Для исследования долговременной стабильности образцы крови с концентрациями 0,1 и $1,0 \text{ мкмоль/дм}^3$, оставляли на хранение при -40°C в течение 14 суток для последующего анализа. Оба образца анализировали перед замораживанием и после оттаивания в 6 параллельных измерениях, и рассчитывали среднее значение (таблица 6).

Таблица 6 – Результаты исследования долговременной стабильности ($n = 6$, $p = 0,95$) при -20°C

Номер образца	1	2
X_n , мкмоль/дм^3	0,100	1,00
$X_{\text{ср}}$, мкмоль/дм^3 (до замораживания)	$0,103 \pm 0,006$	$1,06 \pm 0,05$
$X_{\text{ср}}$, мкмоль/дм^3 (после оттаивания)	$0,093 \pm 0,005$	$0,97 \pm 0,04$
Убыль, %	9,57	8,70

Таким образом, было показано, что за 14 суток хранения в морозильной камере (-40°C) образцы крови теряют до 10 % введенного ГС. Поэтому при изучении фармакокинетики лекарственных средств на основе ГС экспериментальные образцы крови могут храниться при -40°C до проведения анализа.

Не маловажным является установление мешающих факторов матрицы анализируемого объекта. Как было показано в результатах определения влияния высаливающих и денатурирующих агентов на степень извлечения, ГС не связывается с белками крови. Для подтверждения этого подготовлены различные образцы крови двух видов животных, содержащие добавки компонентов крови: 1;

2; 3 % человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), 5 % гемоглобина, 10 % форменных элементов крови (ФЭК) и 5 % холестерина. В образцы введено известное количество лекарственного средства на основе ГС перед анализом по разработанной методике, результаты приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Определение ГС в образцах крови крыс и кроликов с добавками ее компонентов (n = 6; p = 0,95)

Введено ГС, мкмоль/дм ³	Добавленный компонент крови	Найдено (C±ε), мкмоль/дм ³	
		Кровь крыс	Кровь кроликов
1,0	1 % ЧСА	0,94±0,07	0,98±0,05
	2 % ЧСА	0,95±0,06	1,05±0,06
	3 % ЧСА	1,03±0,05	0,96±0,05
	гемоглобин	1,04±0,05	0,97±0,05
	ФЭК	0,93±0,06	1,03±0,05
	холестерин	0,96±0,06	0,96±0,06
	-	1,03±0,05	1,01±0,04

Таким образом, доказано отсутствие влияния состава крови (уровень ЧСА, гемоглобина, ФЭК и холестерина) на степень извлечения ГС при разработанных условиях пробоподготовки.

Для оценки предела обнаружения ($C_{min,p}$) использован подход, основанный на определении критерия Кайзера. Значения $C_{min,p}$, определенные по этому критерию вблизи нижней границы диапазона линейности, приведены в таблице 8. Таблица 8 – Результаты расчета предела обнаружения ($C_{min,p}$) ГС в экспериментальных образцах крови

Введенная концентрация ГС (C_0), мкмоль/дм ³	Средняя $\bar{C}$, мкмоль/дм ³	σ , мкмоль/дм ³	$C_{min,p}$, мкмоль/дм ³
0,060	0,065	0,008	0,025
0,090	0,099	0,010	0,029

Введенная концентрация ГС (C_0), мкмоль/дм ³	Средняя $\bar{C}$, мкмоль/дм ³	σ , мкмоль/дм ³	$C_{\min,p}$, мкмоль/дм ³
0,120	0,129	0,012	0,037

Определен предел обнаружения гексафторида серы $C_{\min,p} = 0,025$ мкмоль/дм³. Для расчета предела количественного определения нами использовано уравнение: $C_{\lim} = k \times C_{\min,p}$ ($k = 2 - 3$), после проведения расчета установлено $C_{\lim} = 0,05$ мкмоль/дм³.

Таким образом, нами показано, что пределом обнаружения гексафторида серы в образцах крови составляет 0,025 мкмоль/дм³ (3,6 ppb), а рассчитанный предел количественного определения 0,05 мкмоль/дм³ (7,3 ppb). Тем самым удалось добиться при анализе образцов со сложной матрицей чувствительности методики, сопоставимой с аналогичными методиками, применяемыми для определения ГС в атмосфере.

Для определения диапазона линейности исследованы градуировочные зависимости в широком диапазоне концентраций (рисунок 4). Сравнительная (обобщенная) хроматограмма приведена на рисунке 5.

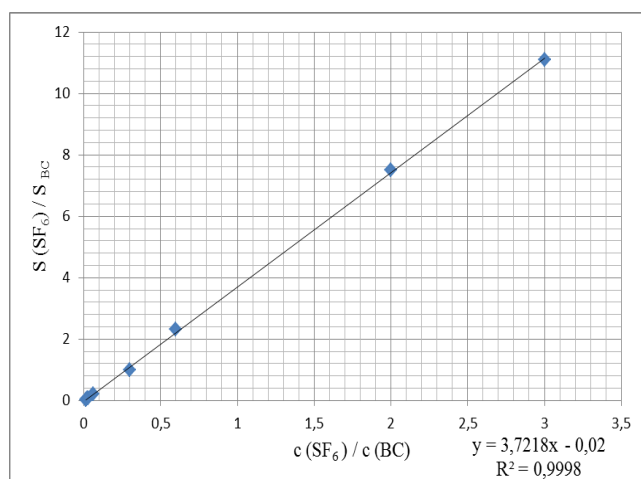


Рисунок 4 – Зависимость отношения площади пика гексафторида серы к площади пика внутреннего стандарта – толуола от отношения их концентраций.

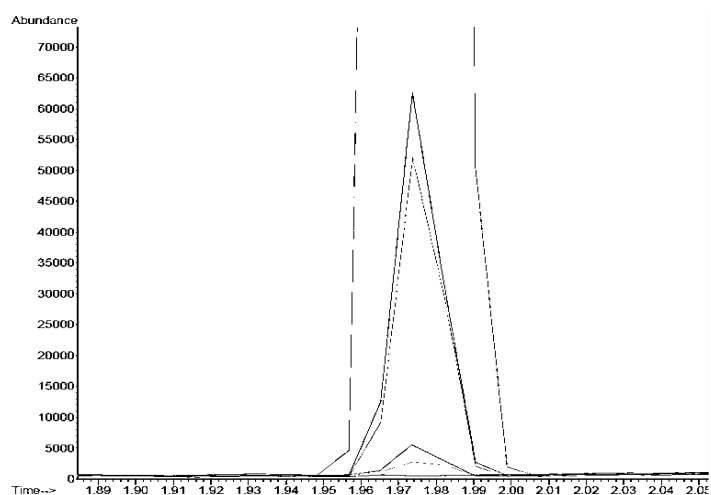


Рисунок 5 – Хроматограммы модельных растворов в диапазоне концентраций ГС 0,06 – 15 мкмоль/л.

Из полученных хроматограмм определили площадь пиков анализируемого компонента смеси (гексафторида серы) и площадь пика внутреннего стандарта (толуола).

Из проведенной работы установлены следующие метрологические характеристики методики определения гексафторида серы в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (таблица 9).
Таблица 9 – Значения показателей точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности методики определения ГС в крови методом ГХ-МС ($p=0,95$).

$C, \text{ мкмоль/дм}^3$	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RЛ}^*, \%$	$\Delta_{с,i}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \%$
15	5	6	5	15
1,5	8	8	6	17
0,12	10	10	7	23
0,09	10	11	8	26
0,06	12	14	9	29

Из приведенных данных можно сделать вывод, что показатель точности при определении ГС в крови методом ГХ-МС не превышает 30 %; а показатели повторяемости и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности 12 и 14 %, соответственно.

Таким образом, проведена метрологическая оценка методики количественного определения гексафторида серы в крови методом хромато-масс-спектрометрии, по основным показателям: предел обнаружения, предел количественного определения, повторяемость ($\sigma_r^* \leq 12 \%$), внутрилабораторная прецизионность ($\leq 14 \%$), правильность ($\Delta_{с,i}^* \leq 9 \%$) и точность ($\Delta^* \leq 29 \%$).

Главным центром гигиены и эпидемиологии ФМБА России (г. Москва) проведена метрологическая экспертиза методики, в заключении которого, методика рекомендована к проведению аттестации.

Проведена апробация разработанной методики в эксперименте на животных: исследована фармакокинетика препарата на основе гексафторида серы

в крови крыс и кроликов, получены основные фармакокинетические зависимости, которые согласуются с исследованиями, проведенными на экспериментальных животных по определению ультразвукового контрастирования: интенсивность акустического сигнала имеет аналогичную зависимость, однако как и предполагалось, после исчезновения УЗ-сигнала, ГС еще обнаруживается в значительных количествах.

При изучении фармакокинетического профиля ГС у крыс и у кроликов была обнаружена только одна фаза снижения концентрации вещества (рисунок 6 и 7). Рассчитанный полупериод элиминации составляет 5,8 мин.

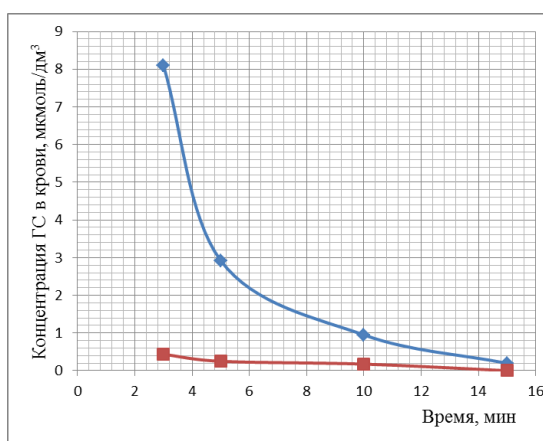


Рисунок 6 – Фармакокинетический профиль гексафторида серы в дозировках 15 и 4 мкл/кг (крысы)

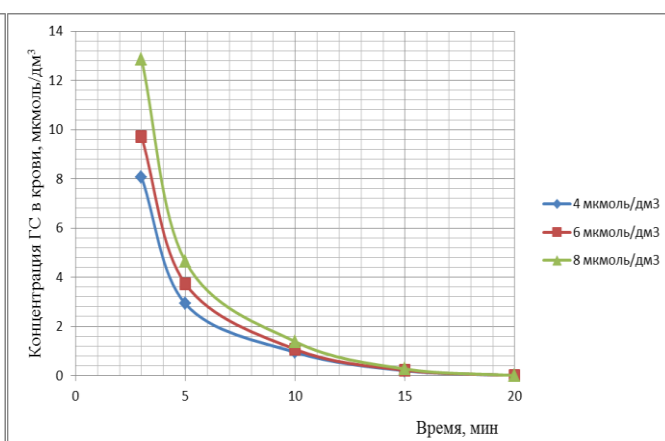


Рисунок 7 – Профиль концентраций ГС в крови кроликов после внутривенного введения в дозах 4; 6 и 8 мкл/кг

Оценена возможность накопления гексафторида серы в организме при многократном его введении в кровь, оценены основные фармакокинетические параметры препарата на кроликах через 7 дней курсового введения. Сравнительный анализ не выявил статистически достоверных различий фармакокинетических параметров после однократного и многократного введения, что указывает на отсутствие эффекта кумуляции гексафторида серы.

Основные выводы

1. Изучено хроматографическое поведение гексафторида серы на капиллярных колонках с различным составом неподвижной фазы. Показано отсутствие сорбции на колонке HP-Innowax при температурах 30 – 50 °С. Определено, что добавка 5 % в состав неподвижной фазы (HP-5ms) фенилполисилоксана уменьшает сорбционные свойства колонки, по сравнению с неподвижной фазой на основе метилполисилоксана (HP-1ms).

2. Проведена оценка влияния температуры источника ионов МС-детектора: при увеличении температуры со 100 до 200 °С, увеличивается общий ток, однако, интенсивность основного иона (127 m/z) снижается на 13 %, а при дальнейшем увеличении температуры до 250 °С происходит еще большая фрагментация иона [SF₅]⁺, и, как следствие, снижается интенсивность сигнала ГС. При выбранной рабочей температуре источника ионов 100 °С масс-спектр ГС более чем на 78 % состоит из сигнала иона [SF₅]⁺ с 127 m/z, что обеспечивает наибольшую чувствительность.

3. Определены рабочие условия ГХ-МС системы для количественного определения ГС: колонка HP-1MS; температура термостата колонок 40 °С; ввод пробы без деления потока; температура источника ионов 100 °С.

4. Изучены параметры жидкость-жидкостной экстракции ГС из крови при использовании органических неполярных растворителей, обладающих наибольшей растворяющей способностью. На основании чего, разработан алгоритм пробоподготовки образцов крови для определения ГС, заключающийся в извлечении гексафторида серы гептаном; соотношение «кровь : гептан» - 1:2.

5. Предложена методика определения ГС в крови и проведена метрологическая оценка по показателям повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, правильности и точности. Показана линейность градуировочной зависимости ГС в диапазоне концентраций ГС 0,06–15 мкмоль/дм³. Доказано, что результаты, получаемые с помощью разработанной методики не отягощены систематической погрешностью.

6. Проведено изучение фармакокинетики препарата на основе ГС с

помощью разработанной методики на двух видах животных. При изучении фармакокинетического профиля ГС была обнаружена 1 фаза снижения концентрации вещества. Концентрация ГС равномерно снижалась до минимально определяемого уровня в течение 10 – 15 минут. Полупериод элиминации – составил 2,35 минуты. Показано отсутствие кумуляции ГС в организме при многократном введении препарата.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Кривошеков, С.В. Валидация методики определения гексафторида серы в образцах плазмы экспериментальных животных / С.С. Власов, С.В. Кривошеков, М.К. Заманова, М.В. Белоусов, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №4(17). – С.174-179
2. Кривошеков, С.В. Валидация методики количественного определения гексафторида серы в новом контрастном препарате методом газовой хроматографии / С.В. Кривошеков, М.С. Ларькина, С.С. Власов, Л.А. Дрыгунова, А.М. Гурьев, М.В. Белоусов, М.С. Юсубов // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т.51. – № 3. – С.41-44
3. Газосодержащее контрастное средство для ультразвуковой диагностики: пат. 2619353 Российская Федерация: МПК А61К49/22 / Кривошеков С.В., Юсубов М.С., Белоусов М.В., Гурьев А.М. и др.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России. – №2016120846; ; заявл.27.05.2016; опубл. 15.05.2017, Бюл. № 14
4. Кривошеков, С.В. Характеристика полисахаридных комплексов василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.) и василька ложнопятнистого (*Centaurea pseudomaculosa* Dobrocz.) / М.С. Ларькина, С.В. Кривошеков, А.М. Гурьев, Т.В. Кадырова, Е.В. Ермилова, В.В. Коцерубская, М.С. Юсубов // Химия растительного сырья. – 2016. – № 2. – С.19-24
5. Кривошеков, С.В. Водорастворимые полисахариды травы люцерны посевной *Medicago sativa* (Fabaceae) флоры Красноярского края / К.И. Ровкина, С.В. Кривошеков, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов // Химия растительного сырья. – 2017. – №2. – С.57-64

6. Кривошеков С.В. Определение гексафторида серы методом ГХ-МС с использованием капиллярной колонки // XX Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием). Тезисы докладов (Нижний Новгород, 10 – 20 апреля 2017 г). Нижний Новгород: Университет Лобачевского, 2017. – С.319-320

7. Кривошеков С.В. Подбор условий хромато-масс-спектрометрического определения гексафторида серы // Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования сборник статей по материалам XIII-XIV международной научно-практической конференции. М.: ООО «Интернаука». – 2018. – С. 50-54.

Кривошеков Сергей Владимирович

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В КРОВИ МЕТОДОМ
ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Подписано в печать 16.10.2018 г. Тираж 100 экз.
Кол-во стр. 22. Заказ 182
Бумага офсетная. Формат А5. Печать RISO.
Отпечатано в типографии ООО «СПБ Графикс»
634034, г. Томск, ул. Усова 4 а, оф. 150.
тел. 89039547362