

1 – ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2

2 – ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, Россия, г. Томск, пр-т Ленина, 30

1 – Siberian State Medical University, 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634055, Russia

2 – National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin Avenue, Tomsk, 634050, Russia

\* адресат для переписки:  
E-mail: unreal800@gmail.com  
Тел.: 8 (960) 974 51 40

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В ОБРАЗЦАХ ПЛАЗМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

С.С. Власов<sup>1,2\*</sup>, С.В. Кривошеков<sup>1,2</sup>, М.К. Заманова<sup>2</sup>, М.В. Белоусов<sup>1</sup>,  
А.М. Гурьев<sup>1</sup>, М.С. Юсубов<sup>1,2</sup>

**Резюме.** Проведена валидация методики количественного определения действующего вещества нового контрастного препарата на основе гексафторида серы (ГС) в плазме крови крыс. Коэффициент корреляции линейной зависимости составил 0,9990 в диапазоне концентраций ГС от 0,003 до 0,500 мкл/мл. Предел количественного определения с соотношением сигнал/шум, равным 10,12 составил 0,003 мкл/мл. Межсерийная и внутрисерийная точность от номинальных концентраций составили 100,40–101,20% и 86,67–110,0% соответственно. Коэффициенты вариации межсерийной и внутрисерийной сходимости составили 3,68–4,15% и 1,23–10,68% соответственно. Для определения стабильности анализировали образцы одной серии с концентрациями 0,01 и 0,50 мкл/мл. Для определения кратковременной стабильности образцы хранили в течение 24 часов. Для определения долговременной стабильности образцы хранили в течение 25 суток. Кратковременная стабильность при комнатной температуре составила 0,52% и 1,86%. Долговременная стабильность при –20 °С составила –90,43% и –81,81%. Точность при замораживании и оттаивании образцов составила 102,30% и 100,10%, а сходимость – 5,40% и 1,50%.

**Ключевые слова:** хромато-масс-спектрометрия, гексафторид серы, УЗ-контрастные средства.

### VALIDATION METHOD FOR DETERMINATION OF THE SULFUR HEXAFLUORIDE IN PLASMA SAMPLES OF EXPERIMENTAL ANIMALS

S.S. Vlasov<sup>1,2\*</sup>, S.V. Krivoshchekov<sup>1,2</sup>, M.K. Zamanova<sup>2</sup>, M.V. Belousov<sup>1</sup>, A.M. Guriev<sup>1</sup>, M.S. Yusubov<sup>1,2</sup>

**Abstract.** A new GCMS-based method for quantitative determination of active substance of new contrast drug based on sulfur hexafluoride (SH) in the rat blood plasma is produced. A ratio plot of peak area of sulfur hexafluoride to peak area of internal standard toluene [ $y$ , S(SH)/S(toluene)] versus concentration of sulfur hexafluoride ( $x$ ,  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) was linear over 0.003–0.500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . The calibration graph can be described by the equation  $y=0.9526x+0.0037$  ( $r^2=0.9990$ ). Limit of quantitation (LOQ) (signal-to-noise 10,12) was 0.003  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Inter- and intra-serial accuracy related to nominal concentrations were 100.40–101.20% and 86.67–110.0%, respectively. The RSD values for inter- and intra-serial accuracy were 3.68–4.15% and 1.23–10.68%, respectively. The samples of the same series with SH concentrations 0.01  $\mu\text{L}/\text{mL}$  and 0.50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  were analyzed in order to determine the stability. Samples were stored for 24 hours to determine the short-term stability. To determine the long-term stability Samples were stored for 25 days. Short-term stability at room temperature were 0.52% and 1.86% and long-term stability at –20 °C were –90.43% and –81.81% for SH concentrations 0.01  $\mu\text{L}/\text{mL}$  and 0.50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , respectively. Accuracy during freezing and thawing of samples were 102.30% and 100.10% and RSD values were 5.40% and 1.50%, respectively.

**Keywords:** gas chromatography-tandem mass spectrometry, sulfur hexafluoride, ultrasound contrast agents.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время ведущая роль в выявлении заболеваемости населения принадлежит методам неинвазивной диагностики, среди которых ультразвуковое исследование занимает в России одну из приоритетных позиций. Высокая распространенность данного метода обусловлена отсутствием инвазивности, лучевой нагрузки и высокой доступностью как для пациентов, так и для медицинских учреждений [1]. К сожалению, данный метод не лишен недостатков, основным из которых является недостаточная информативность, в частности, для визуализации очагов вос-

палительного генеза. Однако благодаря развитию фармацевтической науки и появлению на рынке контрастных препаратов для ультразвуковой визуализации данный недостаток был успешно преодолен.

Применение эхоконтрастных препаратов (ЭКП) при ультразвуковой диагностике повышает точность дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований, диагностическую эффективность установления социально значимых онкологических и кардиологических заболеваний, а также делает ультразвуковую ангиографию конкурентоспо-

собной компьютерной и магнитно-резонансной ангиографии [2].

Контрастные препараты для ультразвуковой диагностики делятся на два поколения. Отличия между препаратами разных поколений в первую очередь заключаются в увеличенном времени контрастирования у препаратов второго поколения [4, 5].

В СибГМУ (г. Томск) разрабатывается отечественный контрастный препарат, позволяющий проводить визуализацию очагов воспаления печени в ультразвуковом исследовании.

Действующим веществом нового контрастного препарата является гексафторид серы, который представляет собой бесцветный газ с очень низкой реакционной способностью, совершенно безвредный для организма и характеризующийся очень ограниченной растворимостью в воде и низким коэффициентом диффузии, что существенно повышает его стабильность в организме в сравнении с воздухом.

Для появления нового контрастного препарата на отечественном рынке необходимо разработать методику определения действующего вещества в плазме крови экспериментальных животных (крыс), которая будет обладать необходимой информативностью и достоверностью данных.

В результате целью настоящей работы являлось проведение валидации биоаналитической методики определения гексафторида серы в образцах плазмы крови крыс, основанной на газовой хромато-масс-спектрометрии.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы

Для разработки методики и проведения ее валидации использовали гексафторид серы (ТУ 6-02-1249-83, ООО «Галополимер»), толуол (ч.д.а., ГОСТ 5789-78, ООО «Компонент-Реактив»), гептан (эталонный, ООО «Компонент-Реактив»).

### Оборудование

Газовый хроматограф Agilent 7860 с масс-селективным квадрупольным детектором Agilent 5975 (Agilent Technologies, США), оснащенный малополярной капиллярной колонкой DB-5ms (5%-фенил-95%-метил-полисилоксановая фаза, длина 30 м, диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм) и устройством для автоматического ввода пробы. Для анализа данных использовали программное обеспечение ChemStation (G1701EA E.02.02.1431, Agilent Technologies, США), идентификацию соединений осуществляли путем сравнения полученных масс-спектров с базой масс-спектров NIST2008.L.

### Условия хроматографирования

Хроматографический анализ проводили в изотермическом режиме при +50 °С. Детектирование проводили в режиме селективного ионного мониторинга. В качестве газа-носителя использовали гелий, поток газа в колонке – 1 мл/мин. Температура испарителя – 150 °С, режим ввода пробы – с делением потока 1:1, объем вводимой пробы – 1,0 мкл. Разделение проводили в режиме программирования температуры: изотерма при 50 °С в течение 10,0 мин, нагрев до 280 °С со скоростью 10 °С/мин, изотерма 5,0 мин.

### Параметры масс-спектрометра

Температура источника ионов – 230 °С, температура квадрупольного – 150 °С, энергия ионизации – 70 эВ. Проведение хроматографического исследования осуществляли в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по выделенным ионам: 127 Да для обнаружения гексафторида серы и 92 Да для обнаружения внутреннего стандарта – толуола. Выбор данных ионов обусловлен отсутствием их в масс-спектре растворителя – гептана. Преимущества селективного сканирования ионов заключаются в увеличении отношения сигнал/шум из-за большего времени накопления данных для интересующих ионов [6]. Главное преимущество режима селективного сканирования ионов заключается в меньшей затрате времени на детектирование ионов, не представляющих интерес для анализа, в результате чего достигаются более низкие пределы обнаружения [7].

### Подготовка растворов внутреннего стандарта и калибровочных образцов

Для повышения достоверности получаемых по данной методике результатов нами использован внутренний стандарт, в качестве которого выбран толуол в концентрации 0,005 мкл/мл. Использование толуола в качестве внутреннего стандарта обусловлено следующими факторами: его время удерживания значительно отличается от времени удерживания гексафторида серы; масс-селективный детектор обладает к нему высокой чувствительностью.

Растворы внутреннего стандарта толуола готовили путем последовательного разведения концентрированного раствора в мерных колбах по следующей методике: 50 мкл толуола помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили до метки гептаном, получали раствор А. 1 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили до метки гептаном, получали раствор А1. Затем 1,25 мл раствора А1 помещали в мерную колбу вмес-

тимостью 5 мл и доводили до метки гептаном, получали раствор В. 1 мл раствора В помещали в мерную колбу вместимостью 5 мл и доводили до метки гептаном, получали раствор С. Концентрации полученных растворов А1, А, В, С составляли 5,0; 0,5; 0,125 и 0,025 мкл/мл соответственно.

Градуировочные растворы гексафторида серы готовили путем разведения насыщенного раствора. Насыщенный раствор готовили путем барботирования гексафторидом серы 4 мл гептана в течение 3 мин. Максимальная концентрация гексафторида серы в гептане составляет 1608 мкл/мл [3]. Далее 0,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили гептаном до метки (раствор С0). Затем 154 мкл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили до метки гептаном, полученный рабочий раствор (К0) имел концентрацию 1,25 мкл/мл. Для построения калибровочной кривой в диапазоне концентраций от 0,003 до 0,500 мкл/мл было приготовлено шесть стандартных растворов К1, К2, К3, К4, К5, К6 с концентрациями 0,003; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 мкл/мл соответственно. Калибровочные растворы готовили путем разведения рабочего раствора К0 и растворов внутреннего стандарта в определенных пропорциях (таблица 1).

Таблица 1.

Приготовление калибровочных растворов

Объем рабочего раствора SF6, мкл	Объем раствора внутреннего стандарта	Объем добавляемого растворителя (гептан), мл*	Концентрация SF6, мкл/мл	Концентрация внутреннего стандарта, мкл/мл
2000,0	1 мл раствора С	2,00	0,5	0,005
400,0	1 мл раствора С	3,60	0,1	
400,0	2 мл раствора С	7,60	0,05	
200,0	1 мл раствора В	23,80	0,01	
100,0	1 мл раствора В	23,90	0,005	
240,0	1 мл раствора А	98,76	0,003	

**Примечание:** \*Указан объем растворителя, добавляемый до метки для получения соответствующих концентраций.

### Подготовка анализируемых образцов

Исследования проводились на половозрелых конвенциональных аутбредных крысах (возраст – 3 месяца, масса тела крыс – 290–320 г), стока CD разводки

отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Крысы находились в стандартных пластиковых клетках фирмы VELAZ на подстилке из мелкой древесной стружки по пять особей в клетке в открытом режиме. Размер клеток для крыс – 57,5×35×18,5 см. Температура воздуха в виварии – 20–23 °С, влажность – не более 50%, объем воздухообмена (вытяжка:приток) – 8:10, световой режим (день:ночь) – 1:1. Кормление животных осуществлялось дважды в день.

Животным вводили экспериментальный препарат в 0,9% растворе натрия хлорида и изотонический раствор (интактная группа) внутривенно в хвостовую вену. Далее через определенные промежутки времени отбирали образцы крови, плазму отделяли центрифугированием. При отборе образцов биологический материал помещался в цитратные вакутейнеры, в которые предварительно был добавлен 1 мл раствора внутреннего стандарта в гептане [концентрация внутреннего стандарта (толуола) в гептане составляла 0,005 мкл/мл], после чего вакутейнеры помещали в морозильную камеру на хранение при температуре –20 °С. Перед анализом образцы размораживали при комнатной температуре, центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 мин, затем отбирали аликвоту супернатанта в объеме 1 мл и помещали в виалу на 2 мл. Далее проводили непосредственное хроматографирование.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

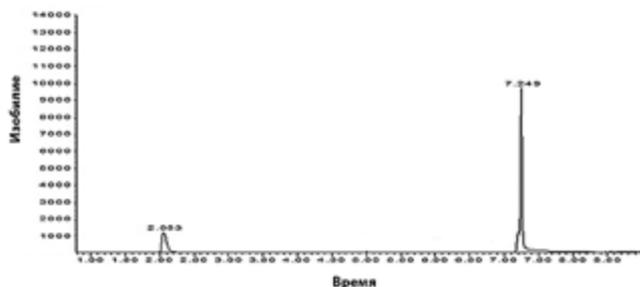
### Результаты валидации методики

#### Специфичность

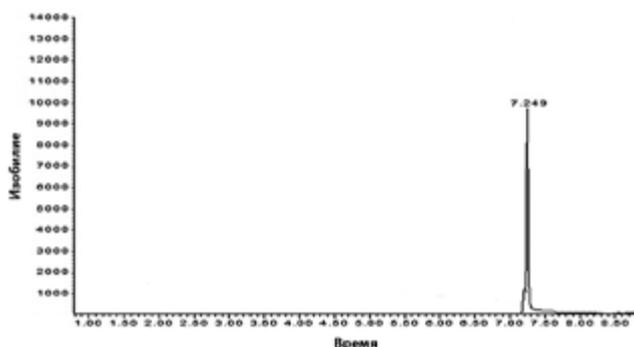
В результате исследования на хроматограмме наблюдалось два пика с временами удерживания 2,053 мин и 7,249 мин, соответствующие гексафториду серы и толуолу (рисунок 1). Сопутствующие вещества, присутствующие в образцах, не влияют на результаты исследования. Вследствие этого обеспечивается специфичность данной методики. При исследовании образца интактной плазмы (рисунок 2) наблюдали один пик со временем удерживания 7,249 мин, соответствующий внутреннему стандарту – толуолу.

#### Линейность

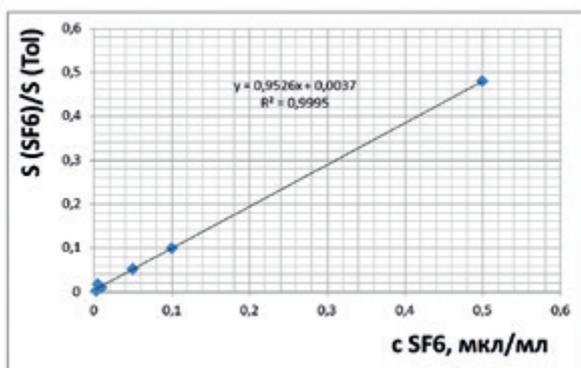
Для определения линейности проводилось исследование шести образцов с концентрациями гексафторида серы 0,003; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 мкл/мл соответственно. По результатам анализа строили график зависимости (рисунок 3) отношения площадей пиков гексафторида серы к площади пиков толуола от концентрации гексафторида серы.



**Рисунок 1.** Хроматограмма раствора гексафторида серы с внутренним стандартом – толуолом



**Рисунок 2.** Хроматограмма интактной плазмы с внутренним стандартом – толуолом



**Рисунок 3.** Калибровочный график зависимости отношения площадей пиков гексафторида серы к площадям пиков внутреннего стандарта – толуола от концентраций гексафторида серы

Исходя из построенного графика коэффициент корреляции ( $R^2$ ) составляет 0,9995, а уравнение кривой имеет вид  $y = 0,9526x + 0,0037$ , следовательно, по полученным данным можно судить о линейности данной методики в диапазоне концентраций 0,003–0,500 мкл/мл.

### **Нижний предел количественного определения**

Для определения нижнего предела количественного определения оценивали соотношение сигнал/шум образца с концентрацией действующе-

го вещества 0,003 мкл/мл. Соотношение составляло 10,12. В результате чего можно судить о том, что данная методика является высокочувствительной и позволяет определять действующее вещество в минимальных концентрациях, близких или равных анализируемой.

### **Внутрисерийная точность и сходимость**

Для определения внутрисерийной точности и сходимости анализировали 24 образца 4 концентраций, включая нижний предел количественного определения (НПКО). Результаты анализа подвергались статистической обработке (таблица 2).

Значения сходимости результатов анализа образцов с концентрациями от 0,01 мкл/мл до 0,5 мкл/мл лежат в диапазоне от 1,23% до 4,76%. В диапазоне предела количественного определения значение сходимости составляет 9,43%. Значения точности лежат в диапазоне от 86,67% до 110,00%. По данным результатам статистической обработки можно утверждать, что данная методика обладает точностью и сходимостью результатов внутри одной серии образцов и по данному показателю удовлетворяет требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам.

### **Межсерийная точность и сходимость**

Для определения межсерийной точности и сходимости анализировали 4 серии образцов. Из каждой серии отбирали по 6 образцов 3 концентраций (всего 72 образца), 0,01; 0,1; 0,5 мкл/мл соответственно. Результаты анализа подвергались статистической обработке (таблица 3).

Значения сходимости результатов анализа лежат в диапазоне от 3,68% до 4,15%. Значения точности лежат в диапазоне от 100,40% до 101,20%. По результатам статистической обработки можно утверждать, что данная методика обладает точностью и сходимостью результатов внутри одной серии образцов.

### **Кратковременная стабильность**

Кратковременная стабильность была подтверждена при хранении образцов в течение 24 ч при комнатной температуре. Для анализа брали 2 образца в двух концентрациях 0,01 мкл/мл и 0,50 мкл/мл соответственно. Образцы анализировали в 6 параллелях, затем рассчитывали среднее значение. Данный параметр оценивали по степени деградаци, которая для образца с концентрацией 0,01 мкл/мл составила 1,86%, а для образца с концентрацией 0,50 мкл/мл составила 0,52%.

Таблица 2.

Статистическая обработка результатов анализа  
(n=6, P=0,95)

№ образца	Xi	Xн	Xср	S	C	A
1 (НПКО)	0,0028	0,003	0,0030	0,000283	9,43	93,33
1.2	0,0026					86,67
1.3	0,0031					103,33
1.4	0,0033					110,00
1.5	0,0029					96,67
1.6	0,0033					110,00
2	0,011					0,010
2.2	0,0098	98,00				
2.3	0,0101	101,00				
2.4	0,0102	102,00				
2.5	0,0099	99,00				
2.6	0,0108	108,00				
3	0,1025	0,100	0,1010	0,00124	1,23	
3.2	0,1012					101,20
3.3	0,0999					99,90
3.4	0,0997					99,70
3.5	0,1023					102,30
3.6	0,1001					100,10
4	0,5021					0,500
4.2	0,5099	101,98				
4.3	0,5369	107,38				
4.4	0,5482	109,64				
4.5	0,5301	106,02				
4.6	0,5020	100,40				

**Примечание:** Xi – полученное значение концентрации, мкл/мл; Xн – номинальное значение концентрации образца, мкл/мл; Xср – среднее значение концентраций образцов, мкл/мл; S – стандартное отклонение; C – сходимость, %; A – точность, %.

Таблица 3.

Статистическая обработка результатов анализа  
(n=6, P=0,95)

Номер серии	Номинальная концентрация вещества, мкл/мл											
	0,01				0,1				0,5			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Xср	0,01 (100,40%)				0,101 (101,20%)				0,503 (100,60%)			
S	0,000417 (4,17%)				0,00411 (4,11%)				0,018488 (3,70%)			
C	4,15				4,06				3,68			
A	100,40				101,20				100,50			

### Долговременная стабильность

Для исследования долговременной стабильности образцы плазмы с концентрациями 0,01 мкл/мл и 0,50 мкл/мл оставляли на хранение при –20 °С в течение 25 суток для последующего анализа. Оба образца анализировали перед замораживанием и после оттаивания в 3 параллелях и рассчитывали среднее значение. Результаты анализа подвергали статистической обработке (таблица 4).

Таблица 4.

Статистическая обработка результатов исследования долговременной стабильности (n=6, P=0,95)

Номер образца	1	2
Xн, мкл/мл	0,01	0,50
Xср, мкл/мл (до замораживания)	0,0103	0,5285
Xср, мкл/мл (после оттаивания)	0,00098	0,09613
Убыль, %	90,43	81,81

### Точность и сходимость результатов по стабильности при замораживании и оттаивании

Для исследования точности и стабильности при размораживании образцы плазмы с концентрациями 0,01 мкл/мл и 0,50 мкл/мл оставляли на хранение при –20 °С в течение 14 дней для последующего анализа. Оба образца анализировали в 6 параллелях и рассчитывали среднее значение. Результаты анализа подвергали статистической обработке (таблица 5).

Точность результатов анализа составила 102,30% и 100,10%, сходимость – 5,40% и 1,50% соответственно, что свидетельствует о подтверждении стабильности при данных условиях.

Таблица 5.

Статистическая обработка результатов анализа (n=6, P=0,95)

Номер образца	1	2
Хн, мкл/мл	0,01	0,5
Хср, мкл/мл	0,0102	0,5005
S	0,000538	0,007605
C, %	5,40	1,50
A, %	102,30	100,10

Таблица 7.

Концентрации гексафторида серы в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг

Концентрация SF <sub>6</sub> , нг/мл	Время, мин			
	3	5	10	15
Хср	9,75	5,58	3,92	0,00
S	0,16	0,15	0,07	0,00
CV, %	1,67	2,60	1,73	0,00

### 3.2. Оценка концентрации гексафторида серы после однократного введения препарата крысам в эффективной дозе

Препарат вводился в концентрациях 4 мкл/кг и 15 мкл/кг. Плазма отбиралась через установленные промежутки времени. Концентрация гексафторида серы в плазме крови выражалась в нл/мл. Рассчитывались средние значения полученных результатов, а также стандартное и относительное отклонение (таблицы 6, 7). Усредненные фармакокинетические профили приведены на рисунке 4.

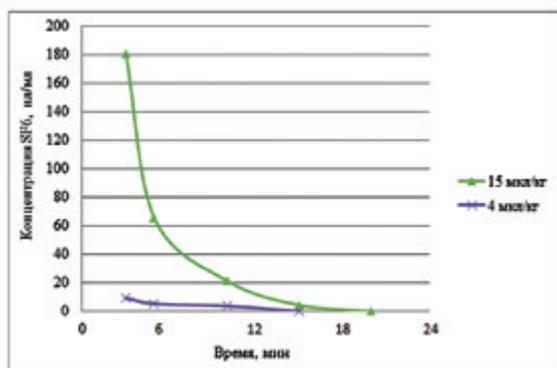


Рисунок 4. Фармакокинетический профиль препарата на основе гексафторида серы в дозировках 15 и 4 мкл/кг

Таблица 6.

Концентрации гексафторида серы в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 15 мкл/кг

Концентрация SF <sub>6</sub> , нл/мл	Время, минут				
	3	5	10	15	20
Хср	180,84	65,37	21,31	4,39	0,00
S	2,16	1,96	0,51	0,16	0,00
CV, %	1,17	3,04	2,48	3,71	0,00

Примечание: CV – коэффициент вариации, %.

Таким образом, валидирована биоаналитическая методика определения гексафторида серы в образцах плазмы крови крыс. Методика апробирована в предварительном эксперименте по исследованию фармакокинетики контрастного препарата на основе гексафторида серы. Предварительное исследование фармакокинетики показало быструю элиминацию гексафторида серы. Полная элиминация лекарственного вещества наступает в течение 20 мин. При последующих экспериментах рекомендуется проводить более частый отбор проб.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В.П. Куликов, К. Вольф. Ультразвуковая диагностика сосудистых заболеваний. – М.: МЕДпресс-информ, 2011. 320 с.
2. M. Lin. Diagnostic performance of contrast – enhanced ultrasound for complex cystic focal liver lesions: blinded reader study // J. Eur. Radiol. 2009. P. 358–369.
3. А.А. Опаловский, Е.У. Лобков. Гексафторид серы // Успехи химии. 1975. Т. 44. № 2. С. 193–213.
4. Патент РФ № 2485976. Контрастное средство для ультразвуковой визуализации. Заявл. 17.05.2011; опубл. 27.03.2013, бюл. № 18. 9 с.
5. S. De Castro, L. Agati, D. Cartoni. Harmonic imaging with Levovist for transthoracic echocardiographic reconstruction of left ventricle in patients with post-ischemic left ventricular dysfunction and suboptimal acoustic windows // J. Am. Soc. Echocardiogr. 2000. P. 139–145.
6. Аналитическая химия. Проблемы и подходы: в 2 т.: пер. с англ. Т. 2 / Под ред. Р. Кельнера, Ж. Мерме и др. – М.: Мир; АСТ, 2004. С. 298.
7. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. Т. 2. С. 265.