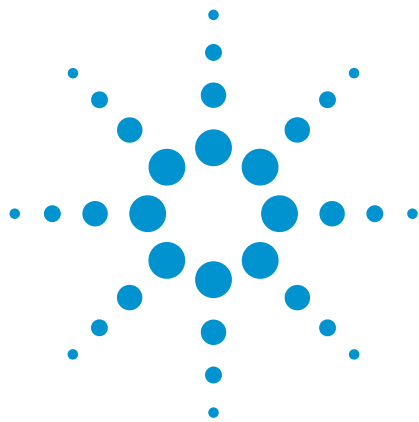




Продукты серии Bond Elut с сорбентом Plexa PCX компании Agilent — катионообменная твердофазная экстракция (ТФЭ)

Путь к повышенной чувствительности при биоанализе методом ЖХ-МС благодаря уменьшенной ионной супрессии

Методическая информация

Фармацевтические средства и дженерики с малой молекулярной массой

Автор

Майк Чанг
Agilent Technologies, Inc.
25200 Commercentre Drive
Lake Forest, CA 92630
USA (США)

Введение

В фармацевтической промышленности в процессе разработки лекарственных средств чрезвычайно важно разработать и провести валидацию скоростных, но не жертвующих чувствительностью методов биоанализа. Ионная супрессия является одной из самых распространенных проблем на пути к этой цели и приводит к занижению обнаруживаемых содержаний, неточности результатов, а также к повышению расходов и затрат времени на техническое обслуживание оборудования. Хотя при работе с биологическими образцами ионной супрессии полностью избежать невозможно, ее следует максимально уменьшать.

Природа гидроксированной поверхности сорбента в продуктах Bond Elut Plexa PCX компании Agilent позволяет им выделяться среди других продуктов для катионообменной ТФЭ, у которых присутствуют амидные остатки на поверхности сорбента. Наличие амидных остатков приводит к усилению взаимодействия между сорбентом для ТФЭ и эндогенными веществами биологической пробы, что и может непосредственно приводить к ионной супрессии в ходе биоанализа. Благодаря гидроксированной поверхности сорбент Bond Elut Plexa PCX уменьшает взаимодействие между сорбентом и эндогенными веществами в биологических образцах, таким образом повышая чувствительность. Приведенное ниже испытание демонстрирует четкие доказательства того, что при использовании монодисперсного полимерного сорбента Bond Elut Plexa PCX для ТФЭ ионная супрессия уменьшается, а чувствительность повышается.



Agilent Technologies

Вещества и методики

Реактивы и растворы для ТФЭ

2% раствор H_3PO_4	развести 20 мкл H_3PO_4 в 1 мл H_2O
2% муравьиная кислота	развести 20 мкл муравьиной кислоты в 1 мл H_2O
Метанол (MeOH)	степень чистоты ч.д.а. или выше
Метанол и ацетонитрил в соотношении 50:50	смешать 1 мл метанола с 1 мл ацетонитрила
5% аммиак в растворе 50:50 метанола и ацетонитрил	добавить 50 мкл разбавленного NH_4OH к 1 мл раствора метанола и ацетонитрила в соотношении 50:50

Метод ТФЭ

Все пробы были подвергнуты исследованию посредством одной и той же методики ТФЭ.

Продукты для ТФЭ	96-луночный планшет Bond Elut Plexa PCX компании Agilent (10 мг) (№ по кат. A4968010)
Сравниваемый 96-луночный планшет W (10 мг)	
Сравниваемый 96-луночный планшет Р (10 мг)	
Проба	100 мкл плазмы крови человека ¹
Предварительная обработка	Развести в 300 мкл 2% раствора H_3PO_4
Условия	1. 500 мкл метанола
	2. 500 мкл воды
Загрузка	400 мкл пробы, разведенной во время предварительной подготовки (фактическое количество плазмы — 100 мкл)
Промывка	1. 500 мкл 2% муравьиной кислоты
	2. 500 мкл раствора ацетонитрила и метанола в соотношении 50:50
Элюирование	2 × 250 мкл 5% аммиака в растворе ацетонитрила и метанола в соотношении 50:50

План эксперимента

Для сравнения ионной супрессии осуществляли ввод холостой пробы плазмы на фоне непрерывного введения смеси лекарственных соединений (50 нг/мл) с помощью шприцевого насоса со скоростью 20 мкл/мин. Холостые пробы плазмы были подготовлены с помощью продуктов Bond Elut Plexa PCX компании Agilent и двух сравниваемых продуктов при использовании методик ТФЭ, описанных в предыдущем разделе. Отслеживание содержания липидов в ходе анализа осуществляли на основании масс-спектрального MRM-перехода 184→ 184.

Условия ВЭЖХ

Колонка	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 5,0 мм, 2,7 мкм (№ по кат. 699775-902)	
ВЭЖХ-МС	ВЭЖХ-МС система Agilent 1260 Infinity	
А	0,1% водный раствор муравьиной кислоты	
В	0,1% раствор муравьиной кислоты в метаноле	
Скорость потока	0,4 мл/мин	
Вводимый объем	10 мкл	
Градиент	Время (мин)	%В
	0	10
	4,0	90
	4,1	10
	6,5	10
Температура	проба (25 °С), колонка (температура окружающей среды)	
Источник ионизации	ионизация распылением в электрическом поле в режиме положительных ионов с использованием технологии JetStream	
Температура газа	350 °С	
Скорость потока газа	10 л/мин	
Давление газа на распылитель	2,4 бар	
Температура вспомогательного периферийного газа	400 °С	
Скорость потока вспомогательного периферийного газа	12 л/мин	
Потенциал на капилляре	4000 В	

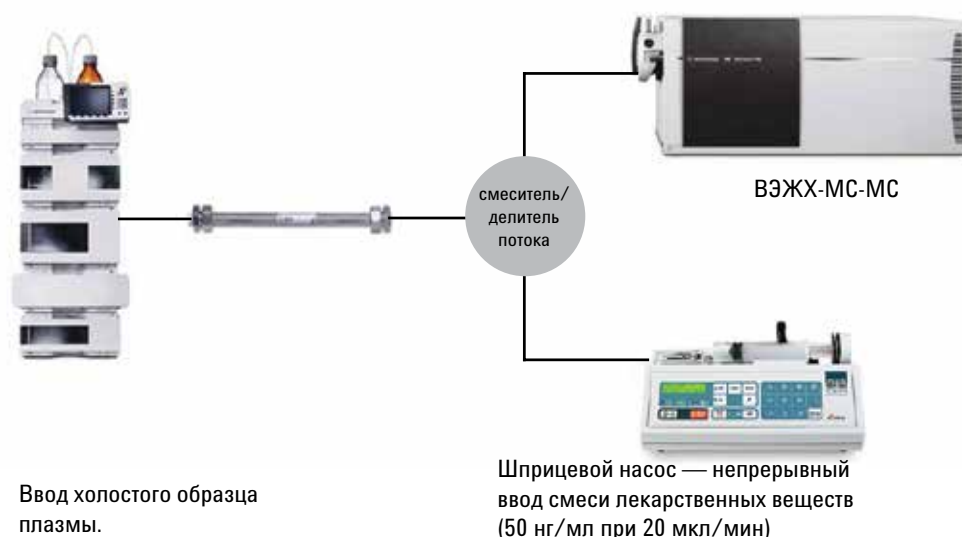


Рис. 1. Схема эксперимента по сравнению величины ионной супрессии

1. Для калибровки и исследования точности воспроизведения содержаний в плазму добавляли лекарственные соединения в соответствующей концентрации. Для сравнения величины ионной супрессии холостые пробы плазмы были подвергнуты ТФЭ.

Табл. 1. Пробы

	pKa	log P	МС-МС MRM-переход	Энергия соударений	Напряжение на фрагменторе
Ацебутолол	9,40	1,71	337,2 → 116,1	20	128
Ранитидин	8,20	0,27	315,2 → 176,1	12	92
Надолол	9,67	0,81	310,2 → 254,1	12	92
Атенолол	9,60	0,16	267,2 → 190,1	12	92
Пропранолол	9,42	3,48	260,2 → 116,2	16	92
Прокаинамид	9,32	0,88	236,2 → 120,1	16	92
Метопролол (внутренний стандарт)	9,70	1,90	268,2 → 116,2	16	92

Результаты и обсуждение

По всем анализам были получены хорошие результаты разделения и удерживания, что отражено на рис. 2. Хроматограммы на рис. 3 были получены в ходе непрерывного ввода смеси лекарственных веществ с введением холостых проб плазмы, которые были подготовлены с помощью каждого из продуктов для ТФЭ. Полученные данные демонстрируют, что при использовании сорбента Bond Elut Plexa PCX компании Agilent ионная супрессия меньше, чем при использовании сравниваемых продуктов для ТФЭ от конкурентов.

Также с помощью Bond Elut Plexa PCX достигаются отличный предел обнаружения и предел количественного определения. Исследование точности воспроизведения содержания проводилось для трех разных уровней концентрации (низкого, среднего и высокого, $n = 6$), а данные в табл. 2 говорят о высокой точности определяемых содержаний и низком остаточном стандартном отклонении (RSD). Для всех соединений наблюдается хорошая линейность с коэффициентом корреляции R^2 не хуже 0,995 (рис. 4).

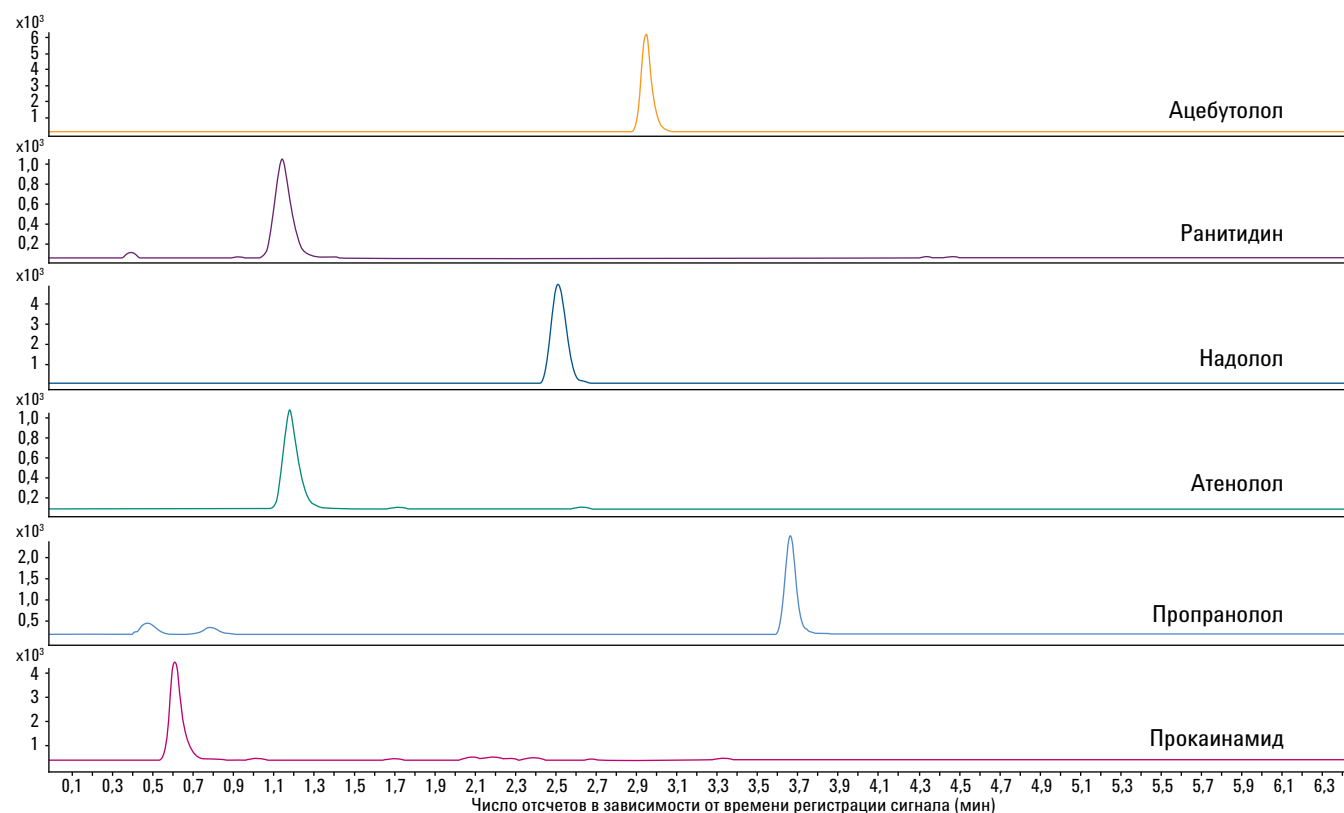


Рис. 2. Хроматограмма с масс-спектральным детектированием для пробы плазмы с добавкой анализируемых соединений, обработанной с помощью продуктов Bond Elut Plexa PCX компании Agilent (5 нг/мл каждый)

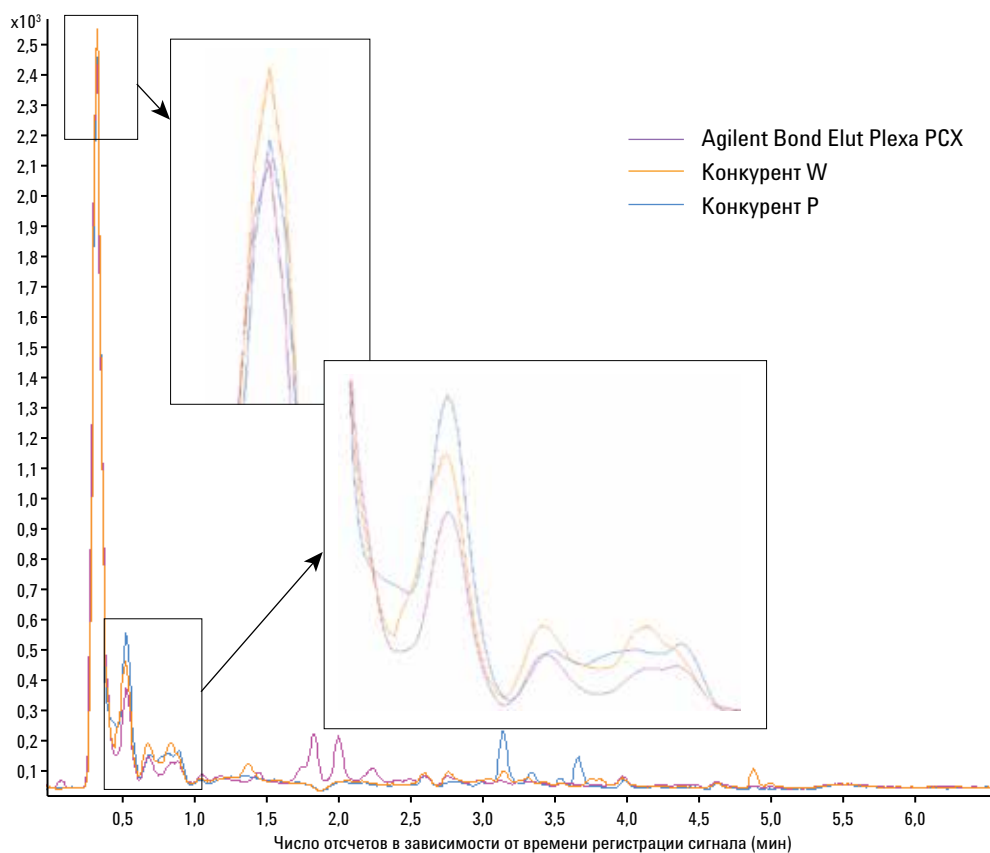
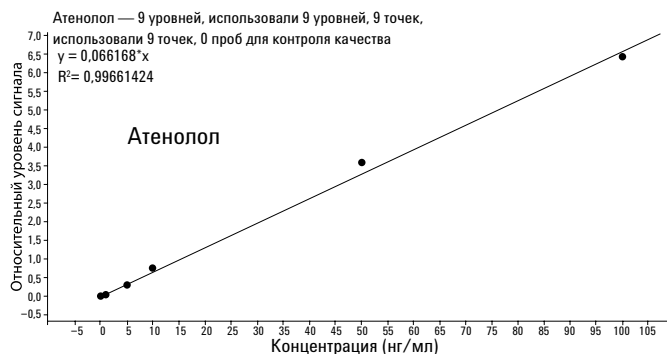
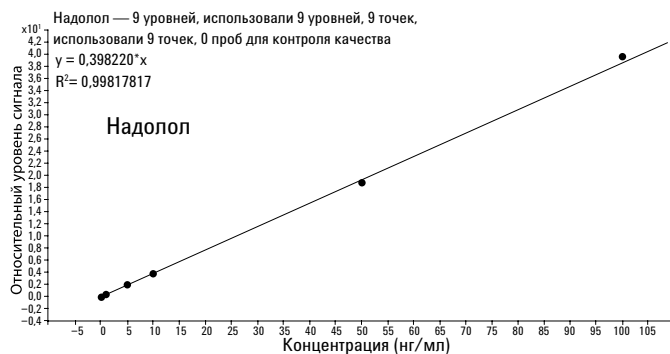
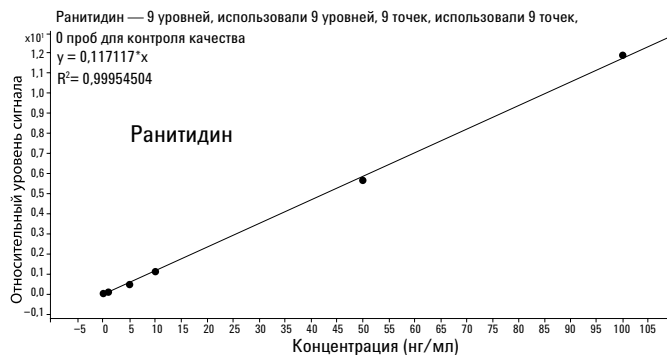
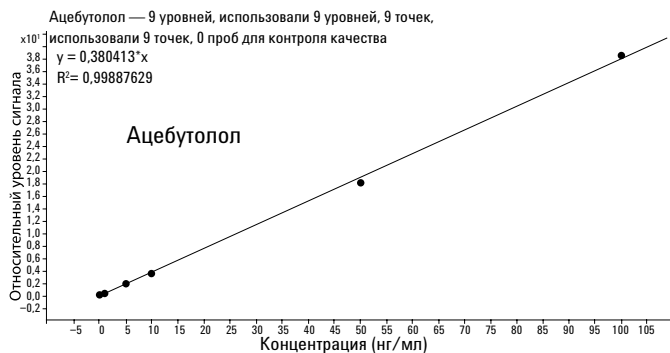


Рис. 3. Отслеживание содержания липидов при введении холостой пробы плазмы с помощью MRM-перехода 184 → 184 m/z



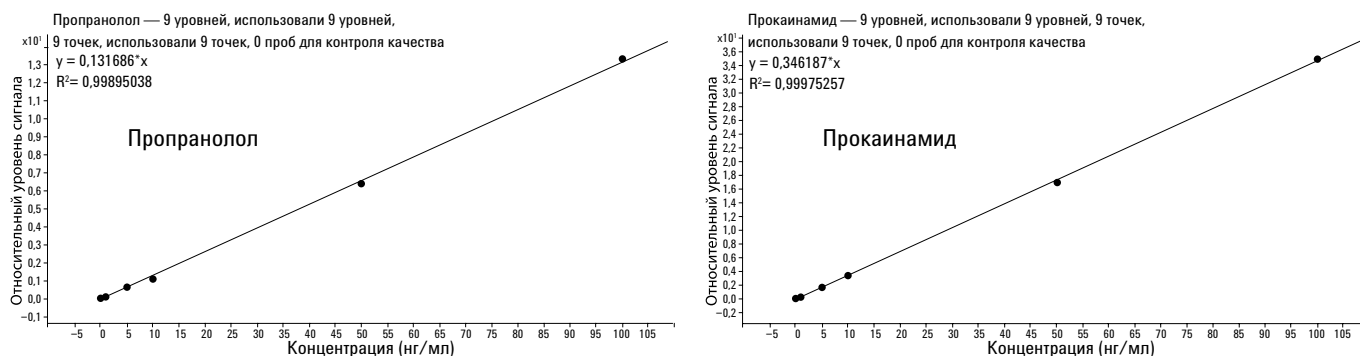


Рис. 4. Калибровочные кривые для шести бета-блокаторов в девяти различных концентрациях (0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50 и 100 нг/мл)

Табл. 2. Краткое описание данных, полученных с Bond Elut Plexa PCX компании Agilent

	pKa	log P	Предел обнаружения (нг/мл)	Предел количественного определения (нг/мл)	5 нг/мл		50 нг/мл		100 нг/мл		Коэффициент корреляции, R ²
					Найденное содержание (% от истинного)	RSD, %	Найденное содержание (% от истинного)	RSD, %	Найденное содержание (% от истинного)	RSD, %	
Атенолол	9,60	0,16	0,05	0,1	109,0	1,2	95,6	2,3	95,5	3,3	0,997
Надолол	9,67	0,81	0,01	0,05	110,8	1,4	120,7	1,5	95,4	1,6	0,998
Ацebutолол	9,40	1,71	0,01	0,1	113,9	0,9	108,6	2,0	98,7	2,4	0,999
Пропранолол	9,42	3,48	0,05	0,1	120,2	1,1	103,5	2,7	93,6	2,5	0,999
Прокаинамид	9,32	0,88	0,05	0,1	93,0	2,1	104,5	1,8	96,9	3,9	1
Ранитидин	8,20	0,27	0,05	0,1	90,7	1,9	96,4	2,7	91,1	3,9	1

Выводы

При использовании сорбента Bond Elut Plexa PCX компании Agilent ионная супрессия меньше, чем при использовании продуктов для ТФЭ от конкурентов. Низкие предел обнаружения (0,01—0,05 нг/мл) и предел количественного определения (0,05—0,5 нг/мл) достигаются благодаря уменьшенной ионной супрессии. Достигаются высокие коэффициенты корреляции (R² не хуже 0,995) и хорошая точность воспроизведения содержания при очень хорошем остаточном стандартном отклонении.

Дополнительная информация

Представленные данные отражают характерные результаты. Для получения дополнительной информации о наших продуктах и услугах посетите наш веб-сайт: www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и технические характеристики в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2011
Напечатано в США
1 декабря 2013 г.
5990-8400RU



Agilent Technologies