

Фракционирование кислых, нейтральных и основных лекарственных веществ из плазмы крови с использованием полимерного катионообменного сорбента для ТФЭ и продукта Agilent Bond Elut Plexa PCX

Методическая информация

Биофармацевтические препараты

Авторы

Уильям Хадсон (William Hudson)
и Андреа Юнкер-Бакхейт
(Andrea Junker-Buchheit)
Agilent Technologies, Inc.

Введение

В последнее время для биоаналитической твердофазной экстракции (ТФЭ) в основном используются полимерные сорбенты. Благодаря простоте использования, хорошему потоку и устойчивости к высыханию в отличие от сорбентов на основе силикагеля, полимерные сорбенты прекрасно подходят для объемных анализов с высоким проботоком, требующих быстрой валидации и минимальной разработки методов. Среди полимерных сорбентов, используемых для экстракции основных лекарственных веществ, часто выбор делается в пользу комбинированных полимеров, поскольку их катионообменные свойства обеспечивают высокую эффективность экстракции. В некоторых исследованиях лекарственных средств из-за ограниченного объема образца может потребоваться за один раз экстрагировать сразу нескольких классов лекарственных веществ. Использование комбинированного полимера — эффективный способ определить несколько классов лекарственных веществ в ходе анализа единственного образца плазмы. Кислые и нейтральные лекарственные вещества могут удерживаться в гидрофобной фракции, в то время как основные взаимодействуют с катионообменными группами сорбента. Затем каждый класс лекарственных веществ может быть отделен от сорбента путем добавления органических растворителей и изменения pH, чтобы элюировали требуемые соединения.

Сорбент Agilent Bond Elut Plexa PCX относится к семейству продуктов Agilent Plexa для полимерной ТФЭ; он разработан на основе методики катионного обмена с использованием комбинированного полимера. Этот усовершенствованный сорбент для ТФЭ посредством гидрофобных взаимодействий удерживает нейтральные и кислые соединения, содержащиеся в биологических жидкостях, и концентрирует основные аналиты благодаря своей способности к катионному обмену. Для фракционирования различных классов соединений с высокой степенью извлечения и получением чистых экстрактов достаточно одного метода. Кислые и нейтральные соединения элюируют в нейтральной фракции, а основные соединения — в основной фракции.

Сорбент Plexa PCX значительно снижает ионную супрессию, поскольку его высокополярная гидроксильная поверхность не содержит амидов. Внешняя поверхность частиц минимизирует проникновение белков внутрь пор и предотвращает связывание фосфолипидов, снижая ионную супрессию. Для кислых, нейтральных и основных лекарственных веществ в плазме крови человека был разработан простой метод экстракции с использованием сорбента Plexa PCX.



Agilent Technologies

Материалы и методы

Таблица 1. Реактивы и растворы для ТФЭ

Реактивы	Растворы
2% ортофосфорная кислота	Добавьте 20 мкл концентрированной H_3PO_4 к 1 мл деионизированной воды
Метанол	Степень чистоты ЧДА или выше
2% муравьиная кислота	Добавьте 20 мкл концентрированной муравьиной кислоты к 1 мл деионизированной воды
Смесь метанола с ацетонитрилом (1:1, об/об.)	Добавьте 1 мл метанола к 1 мл ацетонитрила
5% раствор NH_3 в смеси метанола с ацетонитрилом (1:1, об/об.)	Добавьте 50 мкл концентрированного аммиака к 1 мл смеси метанола с ацетонитрилом (1:1, об/об.)
96-луночный планшет Agilent Bond Elut Plexa по 10 мг (кат. № A4968010)	

Таблица 2. Метод ТФЭ

Предварительная обработка образцов	100 мкл плазмы крови человека. Разведите 2% раствором H_3PO_4 в пропорции 1:3
Подготовка	1. 500 мкл метанола 2. 500 мкл деионизированной воды
Нанесение	Образец со смесью лекарственных веществ при скорости потока 1 мл/мин
Промывка	500 мкл 2% муравьиной кислоты
Элюция 1 (кислые, нейтральные соединения)	500 мкл смеси метанола с ацетонитрилом (1:1, об/об.)
Элюция 2 (основные соединения)	500 мкл 5% раствора NH_3 в смеси метанола с ацетонитрилом (1:1, об/об.)

Все образцы выпарили досуха, а затем растворили в 100 мкл 5 мМ формиата аммония (кислые и нейтральные соединения) или 100 мкл смеси 0,1% водного раствора муравьиной кислоты с метанолом в соотношении 80:20 (основные соединения).

Результаты и обсуждение

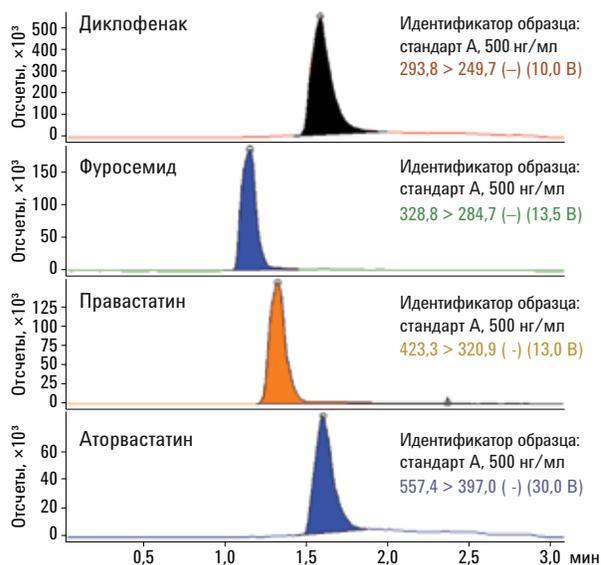
Кислые соединения

Условия ВЭЖХ Кислые и нейтральные соединения

Подвижная фаза	А: 5 мМ формиата аммония В: метанол	
Градиент	t = 0 мин	60% А : 40% В
	t = 0–1 мин	20% А : 80% В
	t = 2–3 мин	60% А : 40% В
Колонка	Agilent Pursuit C18, 2,0×50 мм, 3 мкм (кат. № A3051050X020)	

Условия МС

Соединение	Кислые соединения		
	Q1	Q3	Эн-я соударения
Аторвастатин	557,4	397,0	30,0 В
Диклофенак	293,8	249,7	10,0 В
Фуросемид	328,8	284,7	13,5 В
Правастатин	423,3	320,9	13,0 В
Напряжение на входе в капилляр	80 В		
Температура осушающего газа	350 °С, 2,07 бар (30 psi)		
Индукционная диссоциация	Аргон		
Полярность	Отрицательная		



Хроматограммы 50 нг/мл экстракта.

Кислые аналиты удерживаются сорбентом Plexa РСХ во время гидрофобного взаимодействия, когда рН ниже рКа этих соединений. Предел обнаружения (ПО) комбинированным методом твердофазной экстракции с последующим анализом на ВЭЖХ-МС-МС составил 1,0 нг/мл. Коэффициенты извлечения рассчитывали по уравнению регрессии первого порядка, а значения относительного стандартного отклонения (ОСО) вычисляли на основе выборки n = 6. Был достигнут превосходный выход аналитов, демонстрирующий достаточное удерживание и элюцию, а также минимальную ионную супрессию. Для всех анализируемых соединений отклики были линейными вплоть до третьего порядка величины — от 1,0 нг/мл до 5,0 мкг/мл — с коэффициентами корреляции выше 0,999.

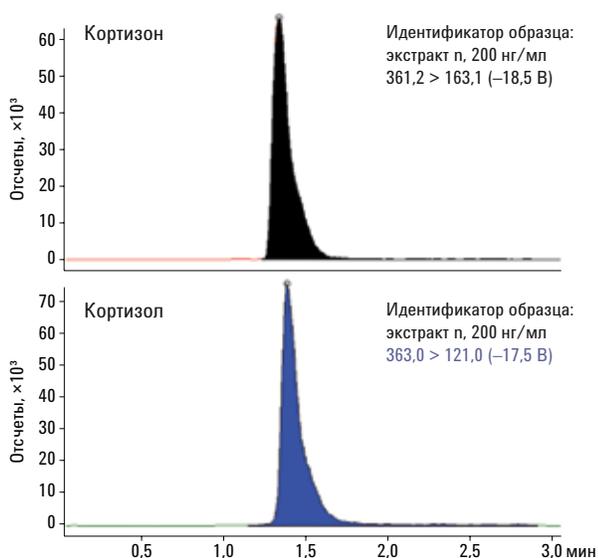
Чтобы продемонстрировать воспроизводимость, провели анализ образцов на двух уровнях концентрации (n = 6). В табл. 3 показано, что описанный стандартный протокол для ТФЭ дает воспроизводимую высокую степень извлечения.

Таблица 3. Относительное извлечение аналита (кислые соединения)

	log P	рКа	0,5 мкг/мл		1,0 мкг/мл	
			Извл. (%)	ОСО	Извл. (%)	ОСО
Диклофенак	4,2	4,2	101	4	103	6
Фуросемид	1,2	3,9	104	3	96	2
Правастатин	2,6	4,7	95	4	106	6
Аторвастатин	6,3	4,5	100	4	103	5

Нейтральные соединения

Условия МС Соединение	Нейтральные соединения		
	Q1	Q3	Эн-я соударения
Кортизон	361,2	163,1	-18,5 В
Кортизол	363,2	121,0	-17,5 В
Напряжение на входе в капилляр	80 В		
Температура осушающего газа	350 °С, 2,07 бар (30 psi)		
Индукционная столкновениями диссоциация	Аргон		
Полярность	Положительная		



Хроматограммы 50 нг/мл экстракта.

Нейтральные соединения имеют такие же характеристики удерживания, как и недиссоциированные кислые соединения, и поэтому элюируются в нейтральной фракции. Предел обнаружения комбинированным методом твердофазной экстракции с последующим анализом на ВЭЖХ-МС-МС составил 1,0 нг/мл. Коэффициенты извлечения рассчитывали по уравнению регрессии второго порядка, а значения относительного стандартного отклонения (ОСО) вычисляли на основе выборки $n = 6$. Был достигнут превосходный выход аналитов, демонстрирующий достаточное удерживание и элюцию, а также минимальную ионную супрессию. Для всех анализируемых соединений отклики были линейными вплоть до третьего порядка величины — от 1,0 нг/мл до 5,0 мкг/мл — с коэффициентами корреляции выше 0,998.

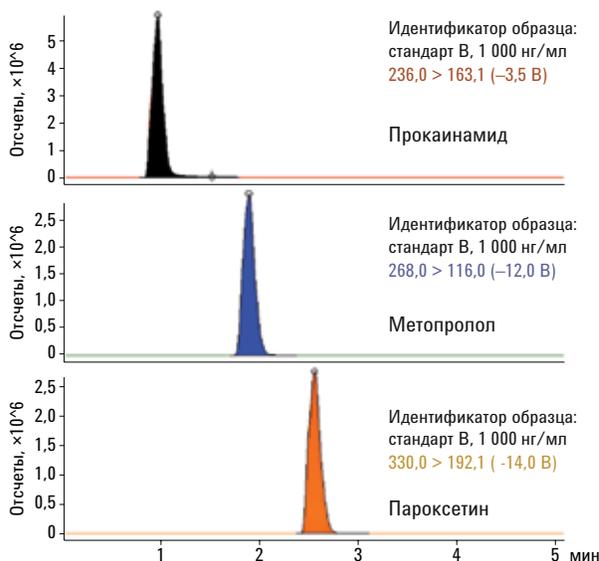
Таблица 4. Относительное извлечение аналита (нейтральные соединения)

	log P	pKa	0,5 мкг/мл		1,0 мкг/мл	
			Извл. (%)	ОСО	Извл. (%)	ОСО
Кортизон	1,5	Не прим.	93	4	97	6
Кортизол	1,5	Не прим.	101	4	101	4

Основные соединения

Условия ВЭЖХ	Основные соединения	
Подвижная фаза	A: 0,1% муравьиная кислота B: метанол	
Градиент	t = 0 мин	80% A : 20% B
	t = 0–2 мин	20% A : 80% B
	t = 3,5–5 мин	80% A : 20% B
Колонка	Pursuit C18 3 мкм, 2,0 × 50 мм (кат. № A3051050X020)	

Условия МС Соединение	Основные соединения		
	Q1	Q3	Эн-я соударения
Прокаинамид	236,0	163,1	-8,5 В
Метопролол	268,0	116,0	-12,0 В
Пароксетин	330,0	192,1	-14,0 В
Напряжение на входе в капилляр	25 В		
Температура осушающего газа	400 °С, 30 psi		
Индукционная столкновениями диссоциация	Аргон		
Полярность	Положительная		



Хроматограммы экстракта в концентрации 50 нг/мл.

Чтобы продемонстрировать воспроизводимость, провели анализ образцов на двух уровнях концентрации (n = 6). В табл. 4 показано, что экстракция, проведенная по стандартному протоколу с использованием Plexa PCX, дала воспроизводимую высокую степень извлечения.

Аналиты из человеческой плазмы, имеющие основную природу, удерживаются сорбентом за счет катионообменного взаимодействия и элюируются отдельно во время использования насыщенной аммиаком смеси растворителей. Предел обнаружения комбинированным методом твердофазной экстракции с последующим анализом на ВЭЖХ-МС-МС составил 1,0 нг/мл. Коэффициенты извлечения рассчитывали по уравнению регрессии второго порядка, а значения относительного стандартного отклонения (ОСО) вычисляли на основе выборки n = 6. Был достигнут превосходный выход аналитов, демонстрирующий достаточное удерживание и элюцию, а также минимальную ионную супрессию. Для всех анализируемых соединений отклики были линейными вплоть до третьего порядка величины — от 1,0 нг/мл до 5,0 мкг/мл — с коэффициентами корреляции выше 0,999. Чтобы продемонстрировать воспроизводимость, провели анализ образцов на двух различных уровнях концентрации (n = 6). В табл. 5 показано, что при экстракции в соответствии со стандартным протоколом была получена воспроизводимая, высокая степень извлечения.

Выводы

Стандартный протокол для экстракции лекарственных веществ из плазмы с использованием сорбента Agilent Bond Elut Plexa PCX может применяться для аналитов, относящихся к различным классам лекарственных веществ. В кислой среде заряженные основные аналиты связываются с катионообменными группами сорбента, в то время как нейтральные и нейтрализованные кислые соединения удерживаются центрами полимерного слоя, имеющими большую гидрофобность. Поскольку неполярный режим ТФЭ характеризуется меньшей селективностью, чем режим ионного обмена, необходимо свести к минимуму влияние ионной супрессии, а также полярных примесей и белков на анализ ЖХ-МС. Для этого вводится цикл промывки кислым водным раствором. Для достижения высокой степени извлечения кислых и нейтральных соединений и получения чистых экстрактов крайне важно проводить элюирование с использованием 50% метанола в ацетонитриле. Для прекращения катионообменного взаимодействия используется смесь органических растворителей с аммиаком, в результате чего элюируют основные лекарственные вещества.

Частицы сорбента Plexa PCX характеризуются низкой дисперсностью, образуя более однородную структуру пор. Однородность частиц Plexa обеспечивает высокую скорость потока по всему 96-луночному планшету и превосходную воспроизводимость от лунки к лунке. Упрощенная автоматизированная технология использования 96-луночного планшета открывает новые возможности для обеспечения максимальной эффективности. Bond Elut Plexa PCX представляет собой полезный инструмент для таких задач ТФЭ, которые требуют проводить анализ образцов с низкими концентрациями аналита и для которых важны высокая производительность, подтвержденная воспроизводимость и быстрое внедрение метода. Для широкого спектра различных соединений нужна минимальная разработка метода. Настоятельно рекомендуется использовать Plexa PCX для биоаналитических исследований, в которых требуется определение сразу нескольких соединений.

Таблица 5. Относительное извлечение аналита (основные соединения)

	log P	pKa	0,5 мкг/мл		1,0 мкг/мл	
			Извл. (%)	ОСО	Извл. (%)	ОСО
Прокаинамид	1,3	9,2	100	5	98	3
Метопролол	1,9	9,6	94	4	92	6
Пароксетин	3,4	9,9	94	5	99	4

www.agilent.com/chem

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc. 2013.

Напечатано в США 19 февраля 2013 г.

SI-01013



Agilent Technologies