

Экстракция полярных основных лекарственных веществ из плазмы с использованием полимерного катионообменного сорбента для ТФЭ и продуктов Bond Elut Plexa PCX

Методическая информация

Биофармацевтические препараты

Авторы

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

Введение

Катионообменные сорбенты идеально подходят для экстракции фармацевтических препаратов, имеющих основную природу. В кислом растворе аналиты легко ионизируются и взаимодействуют с катионообменными группами сорбента. Полярные основные соединения могут вызывать проблемы при использовании обращенно-фазных сорбентов из-за низкой гидрофобности и водорастворимости.

Сорбент Agilent Bond Elut Plexa PCX — это новый представитель семейства продуктов Plexa; в его основе лежит методика полимерного катионного обмена. Plexa PCX использует упрощенный стандартный метод удаления из матрицы нейтральных и кислых примесей и концентрирование основных аналитов, благодаря чему улучшаются аналитические характеристики и повышается чувствительность при количественном определении основных соединений.

Кроме того, Plexa PCX обеспечивает высокую скорость потока и воспроизводимые результаты, результатом чего является превосходная эффективность в каждой пробирке и во всем планшете. Сорбент Plexa PCX значительно снижает ионную супрессию, поскольку его высокополярная гидроксильная поверхность не содержит амидов. Внешняя поверхность частиц сводит к минимуму прочное связывание белков и фосфолипидов, обеспечивая эффективное удаление фосфолипидов из плазмы. Был разработан простой стандартный метод экстракции полярных основных лекарственных веществ в плазме крови человека.



Agilent Technologies

Материалы и методы

Таблица 1. Реактивы и растворы для ТФЭ

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_3OH 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 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 1	500 мкл 2% муравьиной кислоты
Промывка 2	500 мкл смеси метанола с ацетонитрилом (1:1, об/об.)
Элюция	500 мкл 5% раствора NH_3 в смеси метанола с ацетонитрилом

Все образцы выпарили досуха, а затем растворили в 100 мкл смеси 0,1% водного раствора муравьиной кислоты с метанолом (соотношение 80:20).

Результаты и обсуждение

Условия ЖХ

Подвижная фаза:

A: 0,1% муравьиная кислота

B: метанол

Градиент: время t = 0 мин 80% A : 0% B

t = 0–2 мин 20% A : 80% B

t = 3,5–5 мин 80% A : 20% B

Колонка: Agilent Pursuit C18 3 мкм, 2,0 × 50 мм (кат. № A3051050X020)

Условия МС

Переходные ионы (Q1 и Q3) и энергия

соударения (ЭС):

Соединение Q1 Q3 ЭС

Альбутерол 240,1 148,0 –23,5 В

Ламотриджин 256,0 256,0 –5,0 В

Атенолол 267,0 145,0 –34,0 В

Суматриптан 296,1 201,1 –14,0 В

Напряжение на входе в капилляр = 25 В;

температура осушающего газа =

400 °С, 30 psi; индуцированная

столкновениями диссоциация

— аргон

Полярность: положительная

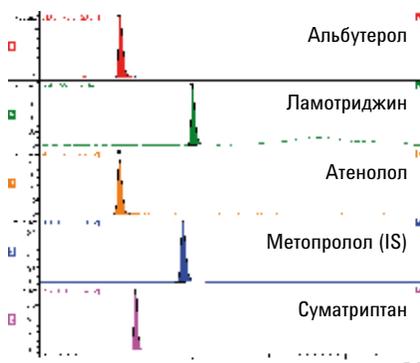


Рисунок 1. Хроматограммы 50 нг/мл экстракта

В данном методе ЖХ-МС описано количественное определение полярных основных соединений в плазме крови человека с использованием продукта Bond Elut Plexa РСХ для ТФЭ (рис. 1). Предел обнаружения (ПО) твердофазной экстракции и анализа ЖХ-МС-МС составил 1,0 нг/мл. Коэффициенты извлечения рассчитывали по уравнению регрессии 2-го 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 3-го порядка величины — от 1,0 нг/мл до 1,0 мкг/мл — с коэффициентами корреляции выше 0,999. Чтобы продемонстрировать воспроизводимость, провели анализ образцов на двух различных уровнях концентрации (n = 6). Как показано в табл. 3, при экстракции в соответствии со стандартным протоколом была получена воспроизводимая, высокая степень извлечения.

Таблица 3. Степень извлечения полярных основных соединений в плазме крови человека

Аналит	log P	pKa	Извл. (%) (500 нг/мл)	ОСО ² (%)	Извл. (%) (1000 нг/мл)	ОСО ² (%)
Суматриптан	0,96	9,6	95	5	97	4
Атенолол	1,30	9,6	94	3	91	2
Альбутерол	1,30	10,3	95	5	100	7
Ламотриджин	1,50	5,7	92	3	97	4

¹Коэффициенты извлечения рассчитывали как % от интенсивности сигнала экстрагированного образца, сравнивая с соответствующей калибровочной кривой. ²Относительное стандартное отклонение (ОСО) = стандартное отклонение/средний коэффициент извлечения × 100; n = 6.

Выводы

Стандартный протокол экстракции лекарственных веществ из плазмы с использованием сорбента Agilent Bond Elut Plexa PCX может применяться к полярным анализам, имеющим основные функциональные аминогруппы. В кислой среде заряженный аналит связывается с катионообменными группами сорбента (см. значения pK_a в табл. 3). А полярные примеси и белки удаляются посредством промывки кислым водным раствором. Нейтральная промывка относительно сильными растворителями, такими как 50% метанола в ацетонитриле, проводится без каких-либо потерь аналита. В ходе промывки выходят нейтральные соединения, удерживаемые в гидрофобном ядре сорбента. Для прекращения катионообменного взаимодействия используется смесь органических растворителей с аммиаком, в результате чего элюируют основные лекарственные вещества.

Скорость потока во всем 96-луночном планшете остается быстрой за счет низкой дисперсности частиц Plexa PCX и отсутствия пылевых частиц, способных вызвать закупорку. Таким образом достигается высокая воспроизводимость во всех лунках планшета. Простая автоматизированная технология использования 96-луночного планшета открывает новые возможности для обеспечения максимальной эффективности. Таким образом, Bond Elut Plexa PCX представляет собой полезный инструмент для таких задач ТФЭ, которые требуют проводить анализ образцов при низких концентрациях аналита и для которых важны высокая производительность, подтвержденная воспроизводимость,

быстрое внедрение и минимальная разработка метода. Поэтому данный продукт рекомендуется к применению для биоаналитических работ в фармацевтических клинических испытаниях, в том числе в контрактных исследованиях.

www.agilent.com/chem

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc. 2012.

Напечатано в США 6 сентября 2012 г.

SI-01015



Agilent Technologies