

Одновременный анализ противогрибковых препаратов в плазме посредством твердофазной экстракции (ТФЭ) с помощью продуктов Agilent Bond Elut Plexa и системы ЖХ-МС-МС Agilent 1260 Infinity

Рекомендации по применению

Биофармацевтические препараты

Автор

Майк Чанг (Mike Chang)
Agilent Technologies, Inc.

Аннотация

Многокомпонентный анализ шести системных противогрибковых лекарственных препаратов в плазме крови человека эффективно достигается посредством системы ЖХ-МС-МС от Agilent, включающей полимерный сорбент Agilent Bond Elut Plexa, колонку Agilent Pursuit XR^{Ultra 2.8} Diphenyl и трехквadrupольный жидкостный хромато-масс-спектрометр (ЖХ-МС) Agilent 1260 Infinity LC.

Сорбент Agilent Bond Elut Plexa обеспечивает получение исключительно чистых проб, что подтверждается обнаружением аналитов в количествах вплоть до пикограммовых. Для всех соединений отношения найденных содержаний к истинным в эталонных образцах были близки к 100% при относительном стандартном отклонении менее 10%. Для калибровочных кривых была достигнута превосходная линейность с $R^2 \geq 0,995$ для всех соединений.

Введение

Системные противогрибковые лекарственные препараты предназначены для лечения грибковых инфекций человека. Имеется информация о многих однокомпонентных методиках анализа; однако многокомпонентные анализы с низкими пределами обнаружения отличаются ограниченной доступностью и пока не применяются [1—4]. Высококачественный планшет Agilent для твердофазной экстракции (ТФЭ) с монодисперсным полимерным сорбентом, Bond Elut Plexa, обеспечивает получение чистых проб и позволяет добиться пределов обнаружения на уровне нескольких пикограммов (пг) для противогрибковых лекарственных препаратов в плазме крови человека. В этих методических рекомендациях представлены данные о хорошем воспроизведении содержаний, линейности и воспроизводимости результатов для противогрибковых лекарственных препаратов в плазме крови человека.



Agilent Technologies

На рис. 1 представлены примеры системных противогрибковых лекарственных препаратов.

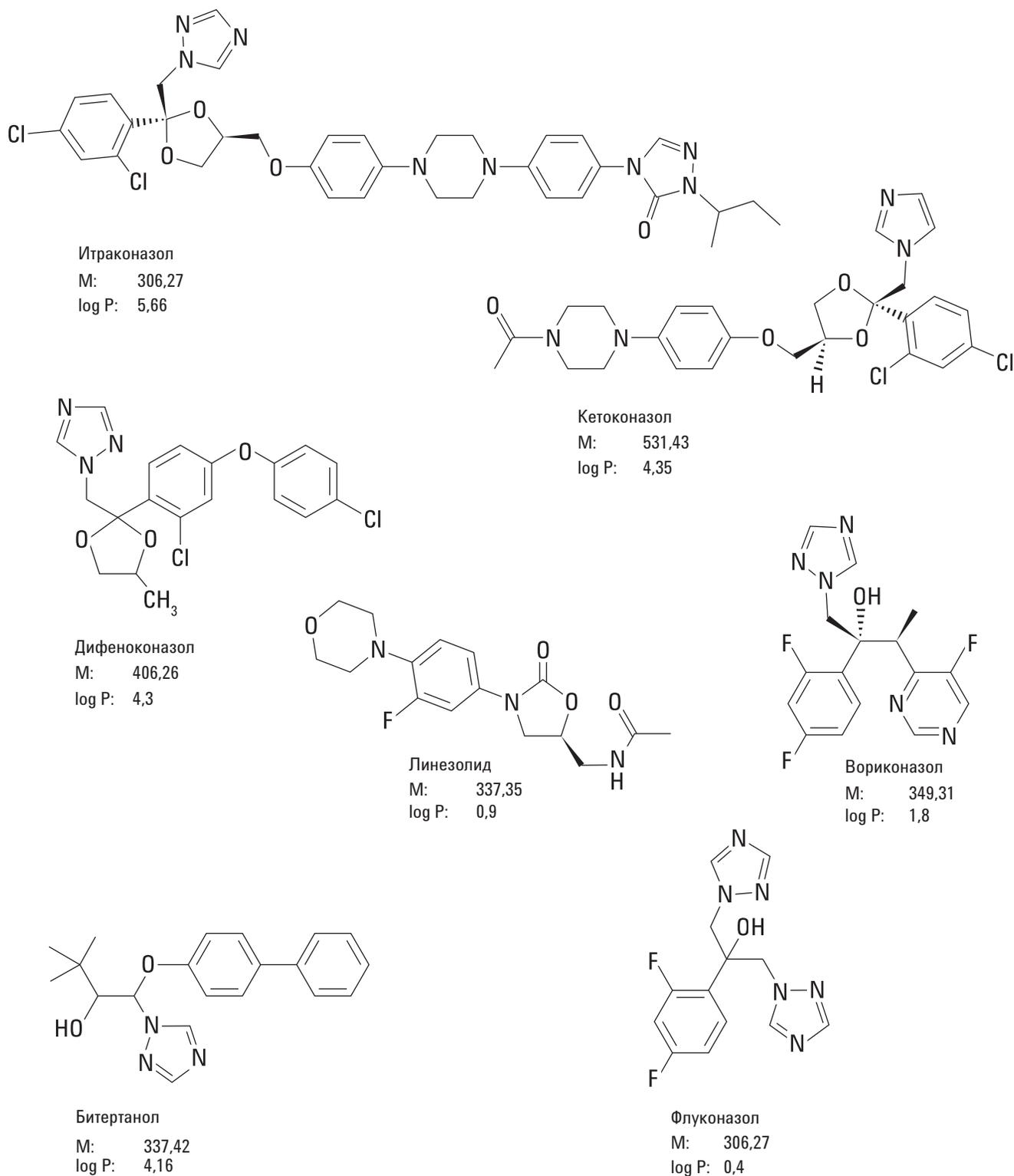


Рис. 1. Структура некоторых системных противогрибковых лекарственных препаратов

Вещества и методики

Реактивы и растворы для ТФЭ

Сорбент ТФЭ:	96-луночный планшет Bond Elut Plexa от компании Agilent (10 мг) (кат. номер A4969010)
Проба:	100 мкл плазмы крови человека с добавлением противогрибковых лекарственных препаратов*
Аммиак:	2%-й водный раствор аммиака добавить 1 мл NH ₄ OH к 50 мл воды
Метанол:	чистый для анализа или более высокой степени чистоты, 10%-й раствор метанола добавить 10 мл метанола к 90 мл воды

Методика ТФЭ

- Предварительная подготовка Развести в 300 мкл 2%-го водного раствора аммиака
- Условия
1. 500 мкл метанола
2. 500 мкл воды
- Загрузка 400 мкл разбавленной пробы со стадии предварительной подготовки (фактическое количество плазмы — 100 мкл)
- Промывка 500 мкл 10%-го раствора метанола
- Элюирование Дважды элюировать 250 мкл метанола
- Выпаривание/
повторное растворение Выпаривание в слабом токе воздуха при комнатной температуре и повторное растворение в 100 мкл 30%-го раствора метанола

* Дифенконазол, внутренний стандарт, добавлялся в концентрации 50 нг/мл во все пробы

Калибровочные пробы готовились в диапазоне концентраций от 0,05 до 100 нг/мл в плазме крови человека при значениях концентраций 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50 и 100 нг/мл. Для итраконазола, линезолида и битертанола в связи с пределами обнаружения использовали диапазон концентраций от 0,5 до 100 нг/мл.

Условия ЖХ-МС

Колонка:	Agilent Pursuit XRs ^{Ultra 2.8} Diphenyl, 2 x 50 мм (кат. номер A7521050X020)	
Прибор:	Трехквадрупольная система ЖХ-МС Agilent 1260	
Подвижная фаза А:	0,1%-й водный раствор муравьиной кислоты	
Подвижная фаза В:	Метанол	
Скорость потока:	0,4 мл/мин	
Вводимый объем:	5 мкл	
Градиент:		
Время:	(мин)	% В
	0	30
	2	85
	4	95
	5	95
	5,1	30
	7	30
Температура:	проба и колонка при температуре окружающей среды	
Ионный источник:	Усовершенствованный источник с ионизацией распылением в электрическом поле в режиме положительных ионов (ESI+) с технологией термоградиентной фокусировки Jet Stream (JST) от Agilent	
Температура газа:	300 °С	
Расход газа:	13 л/мин	
Давление газа распылителя:	3,1 бар (45 psi)	
Температура газовой оболочки:	350 °С	
Расход оболочечного газа	12 л/мин	
Напряжение на капилляре:	4000 В	
Пробы:		

Противогрибковый препарат	log P	Отслеживаемый переход МС-МС		Энергия столкновений	Потенциал фрагментора
Флуконазол	0,4	307,1	238,1	12	92
Кетоконазол	4,35	531,2	82,2	50	164
Итраконазол	5,66	705,3	392,2	36	200
Линезолид	0,9	338,2	148,1	44	128
Вориконазол	1,8	350,1	281,1	12	92
Битертанол	4,16	338,2	70,1	4	128
Дифенконазол (внутренний стандарт)	4,3	406,1	251	24	128

Результаты и обсуждение

На рис. 2 показано, что все соединения были хроматографически разделены на уровне базовой линии и с хорошим удерживанием с помощью колонки Agilent Pursuit XRs^{Ultra 2.8} Diphenyl. С трехкварупольной системой ЖХ-МС Agilent 1260 Infinity для большинства соединений достигались отличные пределы обнаружения в плазме крови человека, вплоть до уровня 0,05 нг/мл.

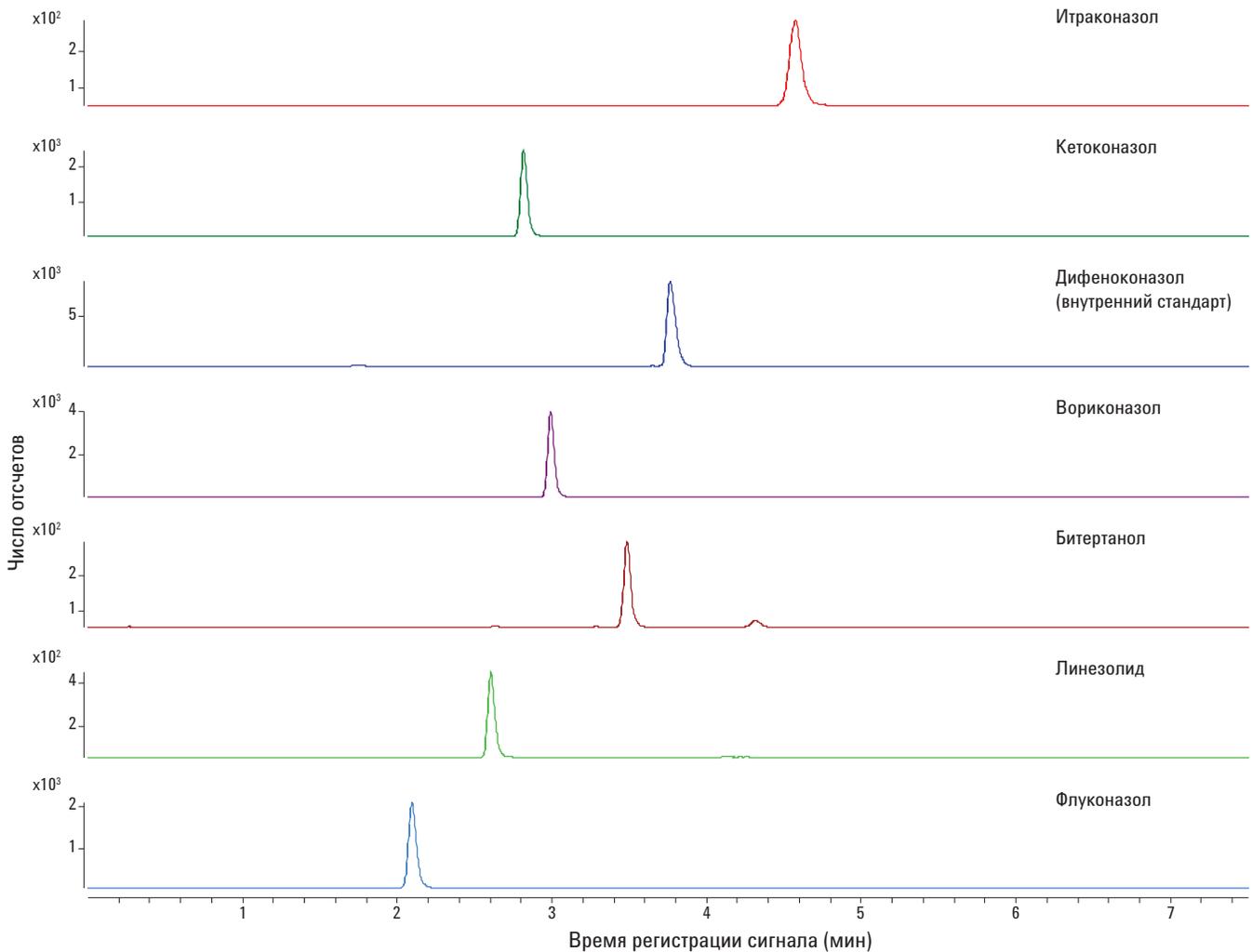


Рис. 2. Хроматограмма с масс-спектральным детектированием для противогрибковых лекарственных препаратов при концентрации 10 нг/мл, добавленных в плазму крови человека (также добавлялся внутренний стандарт с концентрацией 50 нг/мл)

Все соединения продемонстрировали прекрасную линейность с $R^2 \geq 0,995$ во всем диапазоне калибровки (рис. 3).

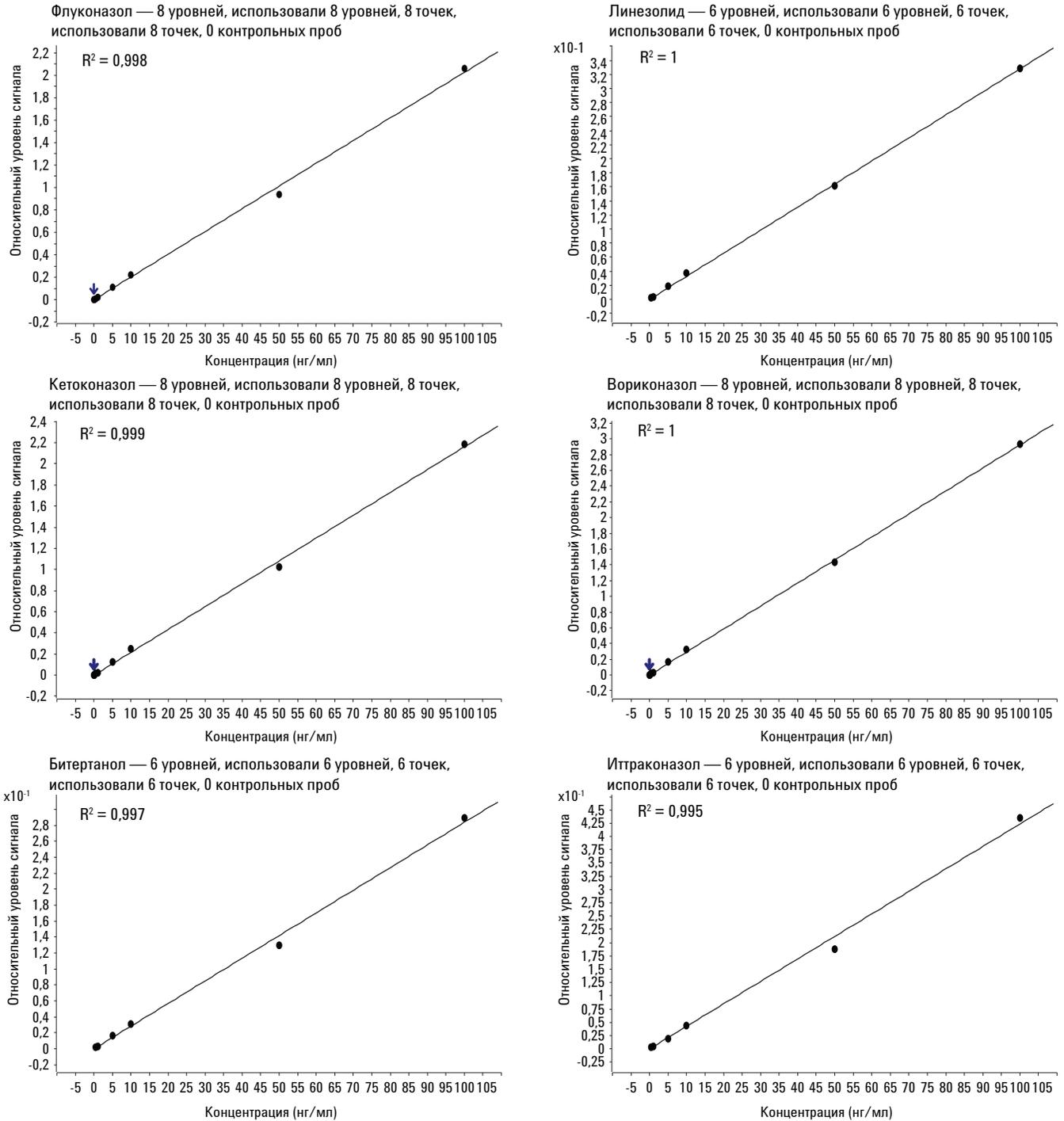


Рис. 3. Калибровочные кривые для противогрибковых лекарственных препаратов в плазме крови человека в диапазоне от 0,05 до 100 нг/мл (использовались итраконазол, линезолид и битертанол в диапазоне концентраций от 0,5 до 100 нг/мл из-за предела обнаружения)

Для четырех уровней концентрации с $n = 6$ пробами был выполнен эксперимент по воспроизведению заданных содержаний: 1, 5, 50 и 100 нг/мл в плазме крови человека. Большинство соединений продемонстрировали высокую точность воспроизведения содержаний и отличные значения относительных стандартных отклонений (% RSD) для всех уровней концентрации.

	Предел обнаружения (LOD)	Предел количественного определения (LOQ)	1 нг/мл		5 нг/мл		50 нг/мл		100 нг/мл		Коэффициент корреляции R^2
			Содержание, % от эталонного значения	RSD (%)	Содержание, % от эталонного значения	RSD (%)	Содержание, % от эталонного значения	RSD (%)	Содержание, % от эталонного значения	RSD (%)	
Флуконазол	0,05	0,05	104	1,7	97	3,8	100	1,4	105	2,1	0,998
Кетоконазол	0,05	0,1	101	1,6	101	2,6	104	3,4	106	4,5	0,999
Итраконазол	0,5	0,5	93,4	5,1	97,8	4,7	88,6	4,1	85,3	5,2	0,995
Линезолит	0,5	1	103	1,9	103	2,5	102	2,5	110	2,2	1
Вориконазол	0,05	0,1	96,8	2,1	94,4	4,4	91,9	8,2	93,4	8,8	1
Битертанол	0,5	1	102	5,9	99,5	3,9	107	1,4	106	3,5	0,997

Выводы

Для нескольких противогрибковых лекарственных препаратов в плазме крови человека была разработана воспроизводимая и точная аналитическая методика. Сорбент Agilent Bond Elut Plexa обеспечивает получение чистых проб, что подтвердило обнаружение противогрибковых препаратов на уровне вплоть до пикограмм. Для всех соединений отношения найденных содержаний к истинным в эталонных образцах были близки к 100% при относительном стандартном отклонении менее 10% для $n = 6$ проб. Для калибровочных кривых была достигнута превосходная линейность с $R^2 \geq 0,995$ для всех соединений.

Литература

1. K. Y. Beste, O. Burkhardt, and V. Kaefer. (2011) "Rapid HPLC-MS/MS method for simultaneous quantitation of four routinely administered triazole antifungals in human plasma" (Быстрая методика одновременного количественного определения в плазме крови человека четырех стандартно назначаемых триазоловых противогрибковых препаратов на основе ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией). *Clinica Chimica Acta*, 413, 240–245.
2. R. J. Mitchell, R. Christian, H. Hughes, A. Miah, and D. K. Walker. (2010) "The application of fully automated on-line solid phase extraction in bioanalysis" (Применение полностью автоматизированной твердофазной экстракции в режиме онлайн к биоанализу). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52, 86–92.

3. M-C. Verdier, D. Bentuy-Ferrer, O. Tribut, and E. Bellissant. (2010) "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of four triazole antifungal agents in human plasma" (Методика на основе сочетания жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией для одновременного количественного определения четырех триазоловых противогрибковых средств в плазме крови человека). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48 (10), 1515–1522.
4. B. V. Araujo, D. J. Conrado, E. C. Palma, and T. Dalla Costa. (2007) "Validation of rapid and simple LC-MS/MS method for determination of voriconazole in rat plasma" (Валидация быстрой и простой методики определения вориконазола в плазме крови крыс на основе сочетания жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 985–990.

Дополнительная информация

Представленные данные отражают характерные результаты. Для получения дополнительной информации о наших продуктах и услугах посетите наш веб-сайт по адресу: 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 спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2013
Напечатано в США
19 февраля 2013 г.
5990-9729RU



Agilent Technologies