



# Количественный анализ уровня лекарственных препаратов в сыворотке крови человека методами ВЭЖХ/МС-МС при помощи Agilent Captiva EMR—Lipid Cleanup

## Рекомендации по применению

Клинические исследования

### Авторы

Лимиан Жао (Limian Zhao) и Дерик Лукас (Derick Lucas)  
Agilent Technologies, Inc.

### Аннотация

Набор Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal—Lipid (Captiva EMR—Lipid) — это продукт для проточной очистки от липидов, выполненный в виде удобного патрона для ТФЭ или в формате 96-луночного планшета. В исследовании продемонстрированы преимущества характеристик методики Captiva EMR—Lipid по сравнению с осаждением белков (PPT) только для количественного определения девяти репрезентативных лекарственных веществ в сыворотке крови человека методом ВЭЖХ/МС-МС. Пробы были приготовлены с помощью метода осаждения белков *in situ* для удаления белка с последующей очисткой с помощью Captiva EMR—Lipid для удаления липидов. Все исследование проводилось с использованием 96-луночного планшета, применяемого для серийных анализов. Количественная методика была утверждена для динамического диапазона 0,5–200 нг/мл для калибровки всех девяти лекарственных соединений в сыворотке с применением изотопных или аналогичных внутренних стандартов. Верификация методики была продемонстрирована при помощи трехдневных циклов анализа точности и воспроизводимости. Результаты показали превосходную линейность калибровочной кривой при  $R^2 > 0,99$ , исключительную точность для всех пяти уровней КК (<20% для нижнего предела количественного определения (НПКО) и <15% для остальных уровней) и воспроизводимость (ОСО <15%). Также были оценены селективность и уровень переноса компонентов пробы в последующие циклы для данной методики. Результаты продемонстрировали, что утвержденный протокол, использующий метод осаждения белка (PPT) *in situ* с последующей очисткой с помощью Captiva EMR—Lipid, обеспечивает существенное усовершенствование надежного количественного определения лекарственных соединений в биологических матрицах.



**Agilent Technologies**

## Введение

Биоанализ для количественного определения целевых лекарственных веществ и их метаболитов в биологических матрицах обычно подразумевает применение высокопроизводительной пробоподготовки с использованием 96-луночных планшетов. Аликвоты проб отбирают непосредственно в 96-луночные планшеты, а процедуры пробоподготовки проводят в 96-луночном формате для экстракции аналита и очистки матрицы. Данный процесс широко распространен в сфере биоанализа благодаря высокой производительности и эффективности, которые он обеспечивает. Верификация методики для биоаналитического количественного анализа обычно предусматривает строгие и детальные требования, включающие линейность калибровочной кривой для дублированных кривых, надежность калибровочных стандартов, точность и воспроизводимость усиленного контроля качества (КК) проб в пределах динамического диапазона, селективность аналитической методики, степень переноса компонентов пробы в последующие циклы, а также проверки стабильности аналитов в процессе обработки проб. Жесткие критерии приемлемости включают точность  $100 \pm 20\%$  для нижнего предела количественного определения (НПКО), точность  $100 \pm 15\%$  для остальных уровней и  $OSD \leq 20\%$  для НПКО, а также  $OSD \leq 15\%$  для остальных уровней<sup>1</sup>.

Техники пробоподготовки, основанные на применении 96-луночного планшета, обычно включают твердофазную экстракцию (ТФЭ), жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ), жидкостную экстракцию на сорбенте (ЖЭС) и осаждение белков (РРТ)<sup>2</sup>. ТФЭ имеет широкий спектр применений для количественного анализа малых молекул в биологических жидкостях методами ВЭЖХ/МС-МС и обеспечивает эффективную очистку матрицы. Тем не менее ТФЭ охватывает большое количество исследований, посвященных разработке аналитических методик, и включает множество этапов для улавливания и последующего элюирования целевого вещества<sup>3</sup>. ЖЖЭ или ЖЭС могут иногда обеспечить более эффективное удаление фосфолипидов, чем ТФЭ, но извлечение высокополярных аналитов обычно вызывает затруднение<sup>4</sup>. Метод осаждения белков — это наиболее простой и дешевый способ пробоподготовки для биологических жидкостей, и поэтому он широко применяется. Органические

растворители, такие как ацетонитрил или метанол, применяются для разложения проб биологических жидкостей с удалением белков. Данный способ не удаляет фосфолипиды, которые могут послужить причиной многих проблем для методики количественного анализа, а также для технического обслуживания оборудования<sup>5</sup>.

Набор Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal—Lipid (Captiva EMR—Lipid) представляют собой серию продуктов, в которых используется инновационный адсорбент, который выборочно удаляет липиды основных классов из матрицы проб без лишних потерь определяемого вещества. Механизм удаления липидов складывается из эксклюзии и гидрофобного взаимодействия между длинной алифатической цепочкой липидных соединений и адсорбента EMR—Lipid. Механизм селективного взаимодействия обеспечивает эффективное удаление фосфолипидов и липидов других классов из биологических жидкостей после осаждения белков (РРТ). Формат патрона/планшета Captiva EMR—Lipid SPE обеспечивает осаждение белков *in situ* с последующей проточной очисткой. Тщательная оценка и сравнение эффективности удаления фосфолипидов из биологических жидкостей представлены в отдельных Рекомендациях по применению<sup>6</sup>, и Captiva EMR—Lipid продемонстрировала исключительно полное удаление фосфолипидов после осаждения белков. В данном исследовании репрезентативные лекарственные препараты с малой молекулярной массой были отобраны для того, чтобы продемонстрировать превосходные результаты, достигнутые при помощи протокола Captiva EMR—Lipid для 96-луночных планшетов при количественном анализе молекул малого размера в биологических жидкостях. При этом данные были получены с помощью осаждения белков только для сравнения производительности. Выбранные лекарственные соединения значительно различались по полярности (от гидрофильных до гидрофобных) и функциональности (кислотные, нейтральные и основные). На рис. 1 представлены химические свойства и структуры целевых веществ. Методику верифицировали в соответствии с методическим руководством по верификации стандартных биоаналитических методик. Воспроизводимость результатов для адсорбента Captiva EMR—Lipid от партии к партии оценивали по степеням удаления фосфолипидов и извлечения аналита для трех отдельных лотов материалов.

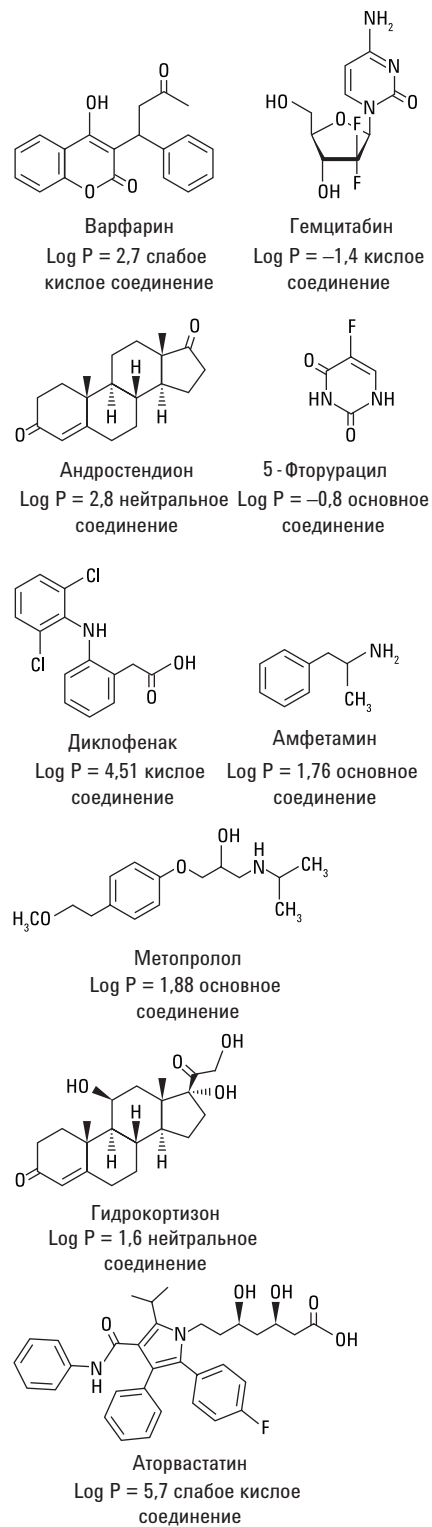


Рис. 1. Химические структуры и свойства репрезентативных лекарственных соединений.

## Экспериментальная часть

### Реагент и химические вещества

Все использованные реагенты и растворители были квалификации «для ВЭЖХ» или «ч. д. а.». Использовали ацетонитрил производства фирмы Honeywell (Маскигон, Мичиган, США) и муравьиную кислоту (ч. д. а.) производства компании Agilent (кат. № G2453-85060). Химические стандарты и прочие химикаты закупали как в виде чистого порошка, так и в виде стандартного раствора производства компании Sigma (Сент-Луис, Миссури, США). Сыворотку крови человека приобретали в компании Biological Specialty Corporation (Колмар, Пенсильвания, США).

### Стандарты и растворы

Исходные растворы стандартов и внутренних стандартов (ВС) готовились в метаноле или ДМСО с концентрацией 2,0 мг/мл. Комбинированный стандартный раствор для добавок был приготовлен на основе смеси ацетонитрил/вода в соотношении 1:1 в концентрации 25 мкг/мл соответственно. Рабочий раствор ВС, добавляемый к аликвотам проб, был с концентрацией 2 мкг/мл в смеси ацетонитрил/вода в соотношении 2:8.

Раствор муравьиной кислоты (1%) в ацетонитриле готовили путем добавления 200 мкл кислоты к 20 мл ацетонитрила. Данный раствор использовали для выделения белков.

Буферный раствор ацетата аммония (5 мМ) с содержанием муравьиной кислоты 0,1% (подвижная фаза А) был приготовлен путем растворения 385,3 мг ацетата аммония к 1 л воды, очищенной с помощью системы Milli-Q, и последующим добавлением 1 мл муравьиной кислоты. Раствор муравьиной кислоты (0,1%) в ацетонитриле (подвижная фаза В) готовили путем добавления 1 мл кислоты к 1 л ацетонитрила.

Раствор ацетата аммония (5 мМ) был получен растворением 77,06 мг ацетата аммония в 200 мл воды, очищенной с помощью системы Milli-Q. Раствор для разведения готовили путем смешивания буфера, описанного выше, и ацетонитрила в соотношении 9:1. Раствор ацетонитрил/вода с соотношением 80:20 готовили путем смешивания 80 мл ацетонитрила с 20 мл воды.

## Условия ВЭЖХ

Параметр	Значение
Колонка	Хроматографическая колонка Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 150 × 2,1 мм, 2,7 мкм (кат. № 699775-902) предколонка Agilent InfinityLab Poroshell 120, EC-C18, 5 × 2,1 мм, 2,7 мкм (кат. № 821725-911)
Скорость потока	0,3 мл/мин
Температура колонки	30 °С
Температура проб в автосамплере	4 °С
Объем ввода	8 мкл
Подвижная фаза	(А) 5 мМ буферный раствор ацетата аммония с 0,1% муравьиной кислоты в воде (В) 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле
Промывка иглы	раствор 1:1:1 ацетонитрил/метанол/изопропиловый спирт/0,2% водный раствор муравьиной кислоты, время промывки: 7,5 с
Градиент	Время (мин) %В Скорость потока (мл/мин) 0 6 0,3 2,5 40 0,3 7,0 90 0,3 7,01 100 0,3
Время элюирования	8 мин
Время промывки колонки после анализа	3 мин

## Параметры масс-спектрального детектирования

Параметр	Значение
Температура газа	120 °С
Расход газа	14 л/мин
Распылитель	40 psi (2,76 бар)
Нагреватель покровного газа	400 °С
Расход распыляющего газа	12 л/мин
Капилляр	3000 В
Параметры iFunnel	Радиочастотное излучение с высоким давлением: 150 В (Пол.), 90 В (Отр.) Радиочастотное излучение с низким давлением: 60 В (+); 60 В (-)
Сбор данных	dMRM

## Оборудование и материалы

### Оборудование, используемое для пробоподготовки

- Центрифуга CentraCL3R (Thermo IEC, Массачусетс, США).
- Пипетки и автоматический дозатор Eppendorf.
- Устройство для работы с жидкостями ViaFlo 96 (Integra, Гудзон, Нью-Гемпшир, США).
- Вакуумный хомут Captiva (кат. № A796).
- Вакуумный насос (Gast, Бентон Харбор, Мичиган, США).
- Концентратор CentriVar, криоловушка и вакуумметр (Labconco, Канзас Сити, Миссури, США).
- 96-луночный планшет Agilent Captiva EMR—Lipid (кат. № 5190-1001).
- 96-луночный планшет для сбора проб объемом 1 мл Agilent Captiva (кат. № A696001000).
- Крышка для 96-луночного планшета Agilent Captiva, 10 шт/уп (кат. № A8961007).

### Параметры оборудования

Пробы анализировали с помощью системы УВЭЖХ Agilent 1290 Infinity, в состав которой входят:

- Бинарный насос Agilent 1290 Infinity (G4220A).
- Высокоэффективный автосамплер Agilent 1290 Infinity (G4226A).
- Отделение термостатируемой колонки Agilent 1290 Infinity (G1316C).

Система УВЭЖХ была подсоединена к трехквadrупольной системе ВЭЖХ-МС Agilent G6490, оборудованной источником электрораспылительной ионизации Agilent Jet Stream iFunnel. Для сбора и анализа данных применялось ПО Agilent MassHunter Workstation.

Параметры dMRM анализа представлены в табл. 1, а хроматограммы и идентификация пиков показаны на рис. 2.

Таблица 1. Параметры ВЭЖХ–трехквadrупольного динамического режима мониторинга множественных реакций и время удерживания для целевых аналитов.

Аналит	ВУ (мин)	Изменение времени удерживания (мин)	Полярность	Ион-предшественник ( $m/z$ )	Ион-продукт			
					Ион-квантификатор	Эн. соудар. (В)	Ион-квалитатор	Эн. соудар. (В)
5-Фторурацил	1,5	2	Отрицательная	129	59,1	29	42,1	17
Гемцитабин	1,7	2	Положительная	264,1	112,2	17	95,1	49
Амфетамин	3,7	2	Положительная	136,1	119,1	5	91	21
Амфетамин-D5 (BC)	3,7	2	Положительная	141,1	124,1	5	93	13
Метопролол	4,1	2	Положительная	268,2	77	69	56,1	41
Гидрокортизон	4,7	2	Положительная	363,2	121,1	25	91	73
Андростендион	6,1	2	Положительная	287,2	109,1	29	97,1	25
Варфарин	6,1	2	Положительная	309,1	251	15	163	8
Аторвастатин	6,3	2	Положительная	559,3	440,2	25	250,1	49
Диклофенак	6,7	2	Отрицательная	294	249,9	9	35,1	45
Прогестерон-D9 (BC)	7,4	2	Положительная	324,3	113,2	29	100	29

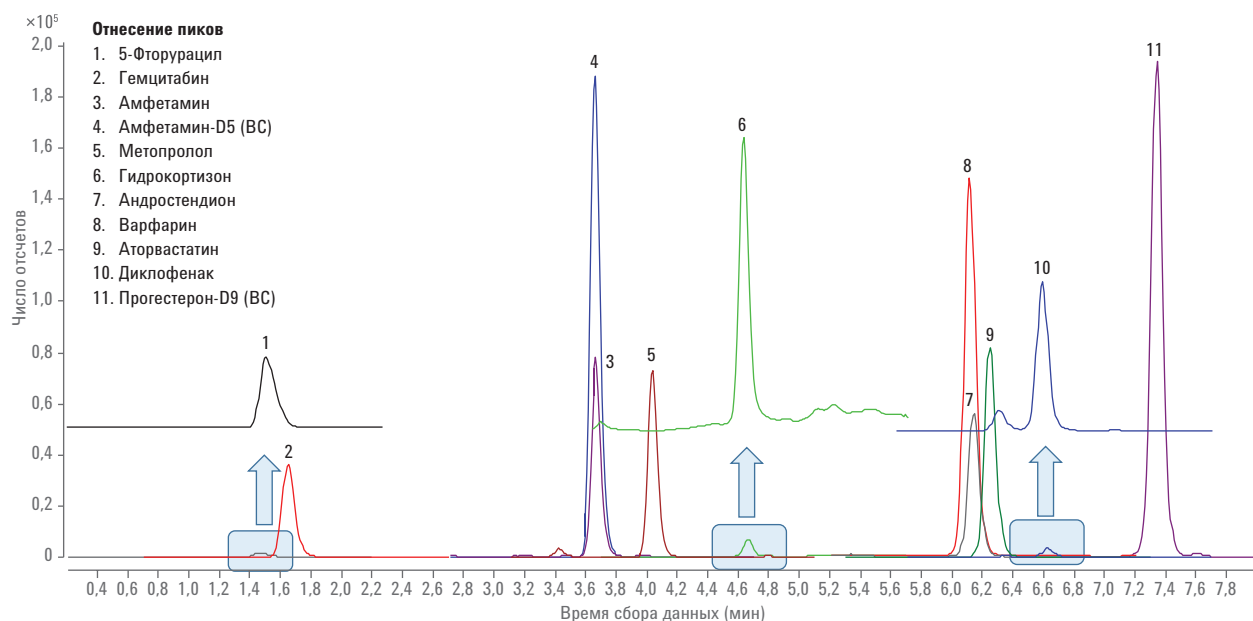


Рис. 2. Хроматограмма ВЭЖХ/МС/МС (DMRM) для пробы человеческой сыворотки, обогащенной 50 нг/мл стандарта лекарственного препарата и 200 нг/мл ВС. Пробы экстрагировались путем осаждения белков с последующей очисткой с помощью Agilent Captiva EMR—Lipid. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном пробоподготовке.

## Подготовка калибровочных стандартов и проб для КК

Стандарты для калибровочных кривых готовят в сыворотке с помощью стандартного рабочего раствора с концентрацией 25 мкг/мл в смеси ацетонитрил/вода с соотношением 1:1. Для того чтобы сократить влияние добавок растворителя на матрицу, для добавления калибровочных стандартов каждый раз готовили свежую промежуточную пробу с концентрацией 250 нг/мл в сыворотке. Динамический диапазон для калибровочной кривой составлял 0,5–200 нг/мл, включая 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 150 и 200 нг/мл. Эти стандарты готовили путем добавления соответствующего объема промежуточной пробы сыворотки к холостой сыворотке с последующей обработкой с помощью вихревой мешалки для лучшего перемешивания. Пять уровней проб для КК анализировали с целью проведения верификационных испытаний точности и воспроизводимости методики. Эти пробы включали концентрации 0,5 нг/мл (НПКО), 2 нг/мл (малая концентрация для КК), 50 нг/мл (средняя концентрация для КК), 150 нг/мл (высокая концентрация для КК) и 200 нг/мл (верхний предел количественного определения (ВПКО)). Данные пробы для КК так же готовили путем добавления соответствующего объема промежуточной пробы сыворотки. Все калибровочные стандарты и пробы для КК готовили в пробирках на 2 мл с защелкивающимися крышками. Далее аликвоты полученных растворов переносили в 96-луночный планшет для проведения экстракции.

## Экстрагирование проб

Подробная информация о процедуре пробоподготовки приведена в табл. 2. Перед добавлением пробы сыворотки в осаждающий растворитель в планшете Captiva EMR—Lipid, важно отобрать аликвоты проб сыворотки в планшет для сбора образцов, а затем добавить раствор ВС. Во-первых, эта процедура облегчает одновременный перенос нескольких проб в планшет EMR—Lipid, позволяя одновременно провести осаждение белков в лунках, и улучшает воспроизводимость обработки проб. Во-вторых, добавление раствора ВС в биологическую матрицу с последующим перемешиванием важно для обеспечения надлежащего уравнивания ВС и связывания с белками до экстрагирования, что гарантирует идентичные свойства внутреннего стандарта и аналита<sup>4</sup>.

Таблица 2. Пробоподготовка сыворотки крови человека с помощью выделения белков с последующей очисткой с помощью Agilent Captiva EMR—Lipid.

Этап	Рабочий параметр
Отберите аликвоту каждой пробы в 96-луночный планшет объемом 1 мл.	100 мкл
Добавьте рабочий раствор ВС к каждой пробе за исключением контрольной холостой пробы или раствор ацетонитрил/вода с соотношением 50:50 к контрольной холостой пробе.	10 мкл
Накройте планшет крышкой и перемешайте с помощью вихревой мешалки со скоростью 2500 об/мин.	1 минута
Добавьте ацетонитрил с 1% муравьиной кислотой в планшет Agilent Captiva EMR—Lipid, расположенный на другом планшете для сбора образцов объемом 1 мл.	300 мкл
С помощью устройства для работы с 96 жидкостями перенесите всю смесь с пробой в планшет EMR—Lipid.	110 мкл
Перемешайте смесь с пробой в планшете EMR—Lipid при помощи пипетки.	3-5 раз
Вставьте хомут CentriVac между планшетом EMR—Lipid и планшетом для сбора образцов.	
Добавьте вспомогательный раствор (ацетонитрил/вода в соотношении 80:20) к каждой пробе.	300 мкл
Создайте необходимый вакуум для постепенного и равномерного элюирования.	2–4 дюйма Hg
В конце увеличьте вакуум для того, чтобы обеспечить прохождение раствора через слой адсорбента в патроне.	8–10 дюйма Hg
Извлеките планшет для сбора образцов и выпарите элюент досуха с помощью CentriVar.	40 °C
Разведите сухой остаток в смеси ацетонитрил/5 мМ буферный раствор ацетата аммония в соотношении 10:90.	100 мкл
Перемешайте с помощью вихревой мешалки со скоростью 2500 об/мин, обработайте ультразвуком и накройте покровной пленкой.	2 мин + 5 мин

## Верификация аналитических методик

Верификация методики проводилась при помощи трехдневных точных и воспроизводимых аналитических циклов. Следующий набор проб использовался в верификационных циклах:

- двойная холостая матрица;
- холостая матрица (с добавкой ВС);
- первый набор калибровочных стандартов;
- 2–3 холостые матрицы;
- НПКО (n = 6);
- проба малой концентрации для КК (n = 6);
- проба средней концентрации для КК (n = 6);
- проба высокой концентрации для КК (n = 6);
- ВПКО (n = 6);

- 2–3 холостые матрицы со следами предыдущей пробы;
- двойная холостая матрица;
- холостая матрица;
- второй набор калибровочных стандартов;
- 2–3 холостые матрицы.

Каждый цикл верификации содержал всего 56–58 проб.

## Исследование подавления сигнала ионами матрицы

Влияние ионов матрицы на сигнал целевого вещества оценивали с помощью постколоночного экстрагирования стандарта<sup>7</sup>. Чистый стандартный раствор, приготовленный с концентрацией 20 нг/мл в смеси ацетонитрил/5 мМ буферный раствор ацетата аммония с соотношением 10:90, вводили после колонки с помощью шприцевого насоса через Т-образный соединитель вместе с потоком из колонки для ВЭЖХ на МС-детектор. Диаграмма настроек для постколоночного введения стандартов представлена на рис. 3. Холостые матрицы, приготовленные согласно различным протоколам очистки, вводили далее в систему ВЭЖХ с помощью вышеприведенных аналитических методик. Каналы MRM для целевых веществ сканировали на протяжении всего 8-минутного хроматографического окна для проведения мониторинга влияния матрицы на сигнал аналита.

## Результаты и обсуждение

В данном исследовании продемонстрировано применение набора для количественного определения молекул малого размера в биологических матрицах.

## Верификация аналитических методик

Количественные результаты для трехдневных циклов анализа точности и воспроизводимости рассматривались с учетом критериев приемлемости для точности и воспроизводимости при НПКО и других уровнях, таких как  $\geq 80\%$  для точности и  $\leq 20\%$  ОСО для уровня НПКО, а также  $\geq 85\%$  для точности и  $\leq 15\%$  ОСО для уровня ВПКО. В общей сложности было измерено 16 калибровочных точек. Любая точка, которая превышает приемочный уровень точности не может быть использована для калибровочных расчетов, но общее число неиспользуемых калибровочных точек не должно превышать 20% от общего числа калибровочных точек, в противном случае результат аналитического цикла считается неприемлемым. Для всех 16 калибровочных растворов должно быть  $\geq 13$  используемых калибровочных точек.

В табл. 3 показаны полученные за один день результаты калибровочной кривой для стандартов. Для всех соединений линейность калибровочной кривой и показатели точности были приемлемыми. Очищенная матрица обеспечивает единообразие сигнала аналита, вследствие чего параллельные калибровочные кривые были линейными и имели небольшое расхождение. С другой стороны, пробы, которые прошли только стадию осаждения белков, содержат в большом количестве фосфолипиды<sup>8</sup>, которые являются причиной возникновения недостоверных сигналов аналитов в ходе анализа, приводящих к расхождению и нелинейности параллельных кривых (рис. 4). Эти расходящиеся кривые и наличие более 30% неиспользуемых калибровочных точек делают результат анализа неприемлемым. В табл. 4 представлены полученные за один день результаты точности и воспроизводимости с целью КК, а на рис. 5 показаны результаты, полученные в разные дни (межсуточные). Результаты точности и воспроизводимости, как полученные в пределах суток, так и межсуточные, соответствовали критериям приемлемости.

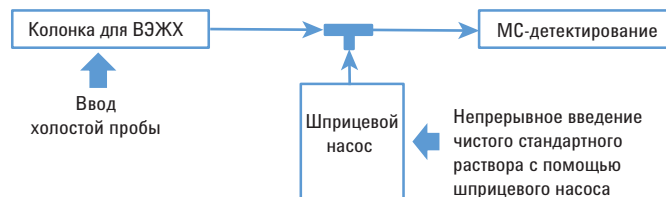


Рис. 3. Диаграмма настроек для постколоночного введения стандарта для оценки подавления сигнала ионами матрицы и проведения сравнительного исследования.

Таблица 3. Сводная таблица результатов трехдневных циклов анализа точности и воспроизводимости калибровочных кривых для стандартов.

Аналит	5-Фторурацил	Гемцитабин	Амфетамин	Метопролол	Гидрокортизон	Варфарин	Андростендион	Аторвастатин	Диклофенак
Калибровочная кривая	Регрессия Вес	Линейный $1/x^2$	Линейный $1/x^2$	Линейный $1/x^2$	Линейный $1/x^2$	Линейный $1/x^2$	Линейный $1/x$	Линейный $1/x^2$	Линейный $1/x$
ВС, используемый для количественного анализа	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Pro-D9	Pro-D9
День 1	Используемые точки (общее количество точек)	14 (16)	15 (16)	16 (16)	16 (16)	15 (16)	15 (16)	16 (16)	15 (16)
	R <sup>2</sup>	0,9929	0,9912	0,9958	0,9907	0,9966	0,9914	0,9989	0,9965
	Средняя точность	97,6	98,7	100,0	100,0	101,5	98,5	100,0	100,2
	ОСО (n = 16)	8,5	7,3	3,8	5,2	5,8	8,2	2,5	3,9
День 2	Используемые точки (общее количество точек)	14 (16)	15 (16)	15 (16)	14 (16)	15 (16)	15 (16)	16 (16)	15 (16)
	R <sup>2</sup>	0,9918	0,9964	0,9975	0,9961	0,9948	0,9912	0,9985	0,9958
	Средняя точность	101,6	99,7	99,9	99,0	99,1	99,6	100,0	98,8
	ОСО (n = 16)	5,8	2,7	2,3	6,3	6,1	6,8	3,7	6,0
День 3	Используемые точки (общее количество точек)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	15 (16)
	R <sup>2</sup>	0,9926	0,9936	0,9953	0,9928	0,9910	0,9929	0,9993	0,9971
	Средняя точность	100,5	99,2	99,7	99,5	99,4	98,9	100,0	100,6
	ОСО (n = 16)	5,0	5,1	4,9	6,7	4,8	2,6	2,2	6,1

Am = Амфетамин; Pro = Прогестерон

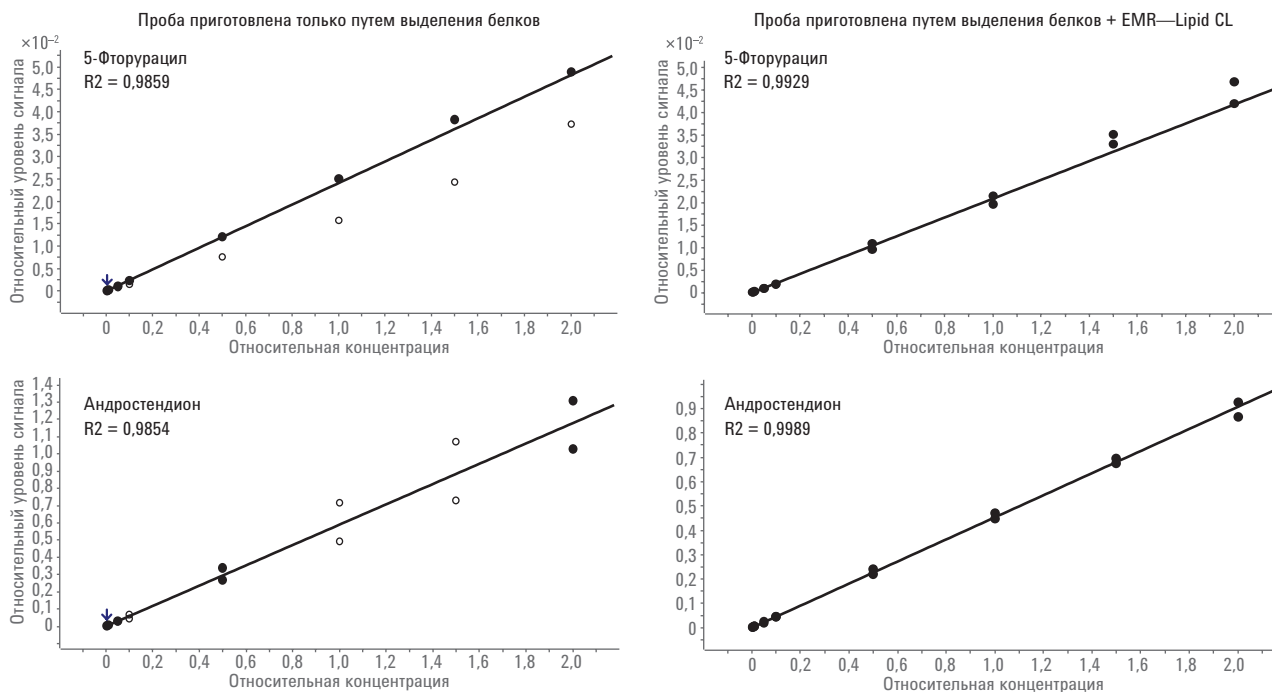


Рис. 4. Сравнение линейности параллельных калибровочных кривых для пробы с применением только выделения белков и выделения белков с последующей очисткой с помощью Agilent Captiva EMR—Lipid.

Таблица 4. Сводная таблица полученных в один день результатов трехдневных циклов анализа точности (%Т) и воспроизводимости (%ОСО) для проб для КК, n=6 для каждого уровня.

Аналит		5-Фторурацил		Гемцитабин		Амфетамин		Метопролол		Гидрокортизон		Варфарин		Андростендион		Аторвастатин		Диклофенак	
		относительное стандартное отклонение (RSD), %	%Т	относительное стандартное отклонение (RSD), %	%Т	относительное стандартное отклонение (RSD), %	%Т	относительное стандартное отклонение (RSD), %	%Т	относительное стандартное отклонение (RSD), %	%Т	относительное стандартное отклонение (RSD), %	%Т	относительное стандартное отклонение (RSD), %	%Т	относительное стандартное отклонение (RSD), %	%Т	относительное стандартное отклонение (RSD), %	%Т
НПКО (0,5 нг/мл)	День 1	103,0	8,0	97,2	5,4	94,4	5,0	105,1	12,2	100,4	2,8	105,9	8,6	99,7	6,9	98,8	8,7	99,9	6,0
	День 2	97,4	5,9	87,2	5,6	93,2	9,5	93,8	9,7	87,5	10,4	87,5	5,1	86,0	10,5	103,5	6,5	90,3	11,3
	День 3	98,4	5,6	88,6	4,2	98,2	2,6	96,7	7,1	87,7	7,3	90,3	4,5	90,3	7,5	92,3	14,1	94,2	14,1
Малая концентрация для КК (2 нг/мл)	День 1	103,7	10,0	90,5	5,5	96,1	4,2	99,7	6,4	103,3	5,2	88,7	6,0	95,8	4,7	94,5	7,3	89,9	14,2
	День 2	97,4	6,5	87,2	7,5	93,2	3,6	93,8	3,6	87,5	4,1	87,5	8,6	86,0	7,0	103,5	6,1	90,3	15,0
	День 3	85,8	6,1	95,2	4,6	100,3	3,8	101,9	10,8	97,9	3,7	99,3	6,2	99,3	6,2	93,8	6,8	91,2	8,1
Средняя концентрация для КК (50 нг/мл)	День 1	107,0	6,3	94,7	3,3	97,9	5,0	107,5	6,9	103,1	4,7	92,2	3,8	104,3	3,8	86,6	12,2	97,3	6,7
	День 2	101,5	7,1	94,3	7,0	100,5	5,0	102,5	9,5	92,5	14,6	97,7	10,4	97,7	3,4	95,9	13,0	93,3	6,5
	День 3	85,8	7,6	95,2	4,2	100,3	6,1	101,9	5,6	97,9	6,5	99,3	5,2	99,3	5,2	93,8	7,1	91,2	8,6
Высокая концентрация для КК (150 нг/мл)	День 1	109,2	11,9	102,8	3,8	98,9	4,1	95,6	4,9	108,7	7,6	101,5	8,0	94,2	3,7	92,5	7,8	96,4	10,5
	День 2	104,4	5,6	99,4	9,3	100,0	5,1	92,3	5,1	101,7	7,8	105,1	6,6	93,4	6,5	93,4	5,1	94,8	6,1
	День 3	110,1	3,1	99,5	6,4	99,7	4,1	92,7	4,4	103,3	6,9	103,6	8,9	105,8	8,0	98,2	7,4	102,7	9,0
ВПКО (200 нг/мл)	День 1	108,7	4,3	106,9	4,3	101,1	5,6	101,3	8,4	112,5	2,6	107,0	8,4	97,6	3,6	85,4	14,2	93,1	4,5
	День 2	104,5	6,6	101,7	7,4	102,7	4,6	94,1	8,7	109,0	4,9	108,5	7,2	101,5	5,0	95,5	8,9	100,9	4,5
	День 3	100,5	6,4	100,7	3,9	99,5	4,6	90,0	1,8	107,3	6,0	110,6	6,7	110,6	6,7	105,8	5,9	110,0	3,4

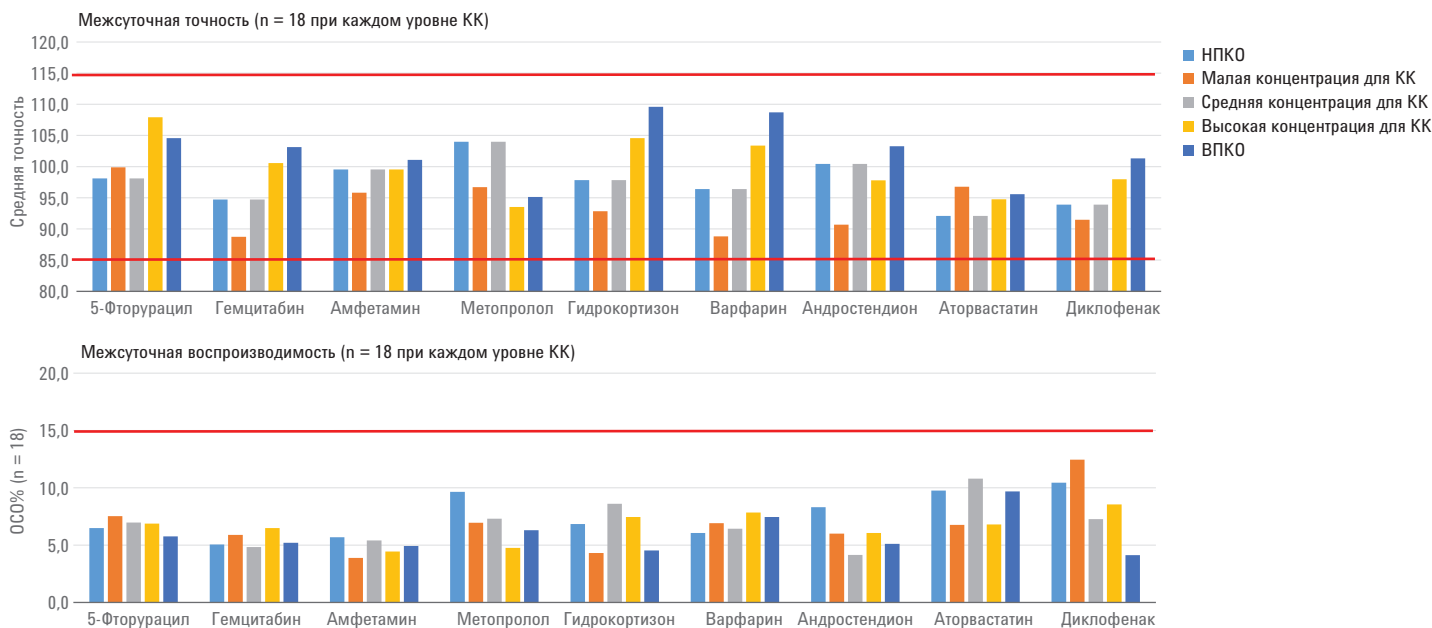


Рис. 5. Сводная таблица межсуточных результатов точности и воспроизводимости для верификации методики.

Анализ холостой матрицы перед анализом калибровочного стандарта с самой низкой концентрацией использовался для определения селективности методики. Помехи от совместно элюирующихся компонентов матрицы не должны превышать 20% от отклика целевого вещества при уровне НПКО. При наличии пика амфетаминов присутствуют помехи, которые могут иногда составлять более 20% от сигнала пика амфетаминов при 0,5 нг/мл. В холостой сыворотке присутствовал гидрокортизон в следовых количествах, но сигнал не превышал 20% отклика соединений при уровне 0,5 нг/мл. Степень переноса вещества из предыдущих проб оценивали с помощью анализа холостых матриц после калибровочных стандартов с наивысшей концентрацией. Для андростендиона, аторвастатина и диклофенака обычно наблюдался перенос вещества из предыдущих проб в следовых количествах. Перенос вещества в следовых количествах устранялся с помощью увеличения времени промывки порта для иглы и более продолжительной промывки колонки после градиентной ВЭЖХ.

На основании трехдневных анализов точности и воспроизводимости методика была верифицирована для определения нескольких лекарственных соединений при помощи одной методики. В данной верифицированной методике использовался ВС (внутренний стандарт). Обычно для проведения биоанализа настоятельно рекомендуют использовать ВС, меченный

стабильным изотопом. Если меченный стабильным изотопом ВС недоступен, необходимо задействовать схожий по структуре аналог ВС<sup>4</sup>. В данной методике в качестве ВС использовали два соединения для девяти лекарственных соединений, и только для амфетамина в наличии имелся меченный стабильным изотопом ВС, амфетамин-D5. Амфетамин-D5 и прогестерон-D9 были использованы в качестве ВС для остальных соединений. Однако установленную методику легко верифицировали с использованием несоответствующего структуре многих соединений ВС, который является неотъемлемой частью матрицы очищенной пробы и сокращает эффект подавления сигнала. Данное преимущество упрощает и делает экономически более выгодной разработку метода и его верификацию.

### Подавление сигнала ионами матрицы

Влияние матрицы определяли в рамках исследования постколоночного введения стандартов, во время которого возможные влияния матрицы оценивали при помощи непрерывной постколоночной инфузии аналита после ввода обработанной холостой сыворотки в колонку для ВЭЖХ. Любые колебания интенсивности сигнала при значении времени удерживания аналита или около него указывают на присутствие веществ матрицы, создающих помехи во время анализа.

Исследование с использованием постколоночной инфузии проводилось при помощи вводов холостой матрицы сыворотки, подготовленной только осаждения белков, осаждения белков с последующей очисткой с помощью Captiva EMR—Lipid или с помощью других продуктов для удаления липидов. Полученные профили перекрывались; их сравнение представлено на рис. 6 в виде хроматограмм целевого вещества, демонстрирующих различный эффект подавления сигнала. Существует три основные зоны возможного подавления сигналов, при времени удерживания (ВУ) 1–2 минуты (зона 1), ВУ 3,5–6 минут (зона 2) и ВУ 6,2–8 минут (зона 3). В зоне 1 наблюдается подавление во всех профилях, возможно вызванное солями, присутствующими в матрице. Подавление сигнала в зоне 2 преимущественно обусловлено влиянием лизофосфолипидов матрицы, а в зоне 3 — влиянием глицерофосфолипидов матрицы. Профиль для пробы после выделения белков и очистки с помощью Captiva EMR—Lipid демонстрирует присутствие равномерного следового количества аналита в отсутствии существенных минимумов в зонах 2 и 3, что указывает на эффективность удаления фосфолипидов. Однако профили проб с осаждением белков и с осаждением белков с очисткой с помощью другого продукта для удаления липидов, демонстрируют наличие значительных минимумов в зонах 2 и 3, указывающих на подавление сигнала, вызванное ионами фосфолипидов. Подавление сигнала ионов целевых веществ в этих зонах, особенно для аналитов, расположенных на границах минимумов, будет влиять на надежность аналитической методики количественного анализа данных аналитов.

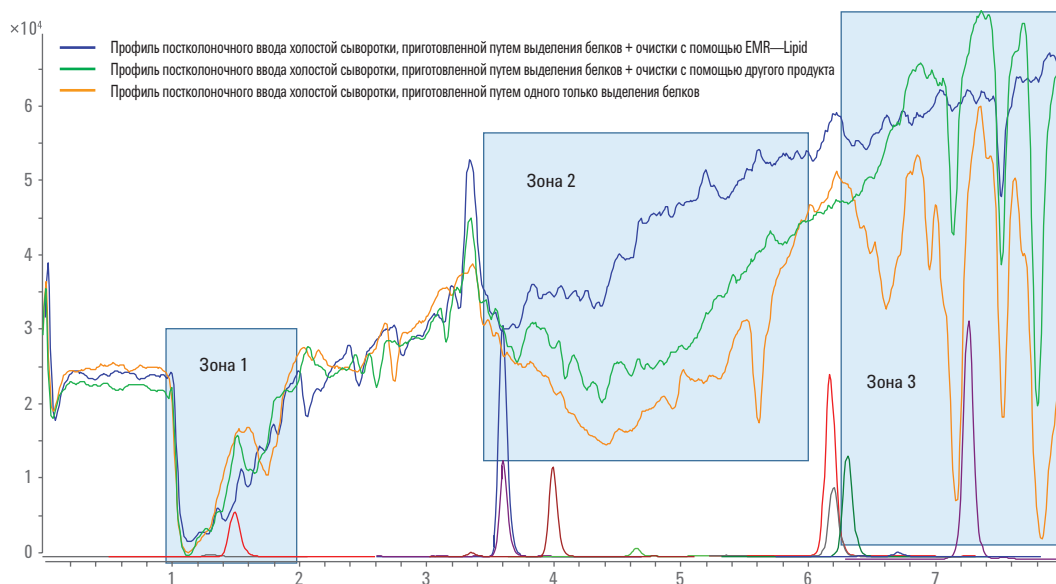


Рис. 6. Сравнение профилей при постколоночном введении стандартов и демонстрация эффекта подавления сигнала целевого вещества ионами матрицы.

### Воспроизводимость результатов для адсорбента Agilent Captiva EMR—Lipid от партии к партии

Воспроизводимость результатов для адсорбента Captiva EMR—Lipid от партии к партии оценивали в отношении удаления фосфолипидов и извлечения аналита при уровне 1 нг/мл с помощью патронов объемом 1 мл, заполненных

адсорбентами из трех различных производственных партий. Все три партии адсорбентов обеспечивали удаление фосфолипидов более чем на 99%. Однородность адсорбента Captiva EMR—Lipid и воспроизводимость от партии к партии также доказываются с помощью единообразия результатов по извлечению аналита, представленных на рис. 7.

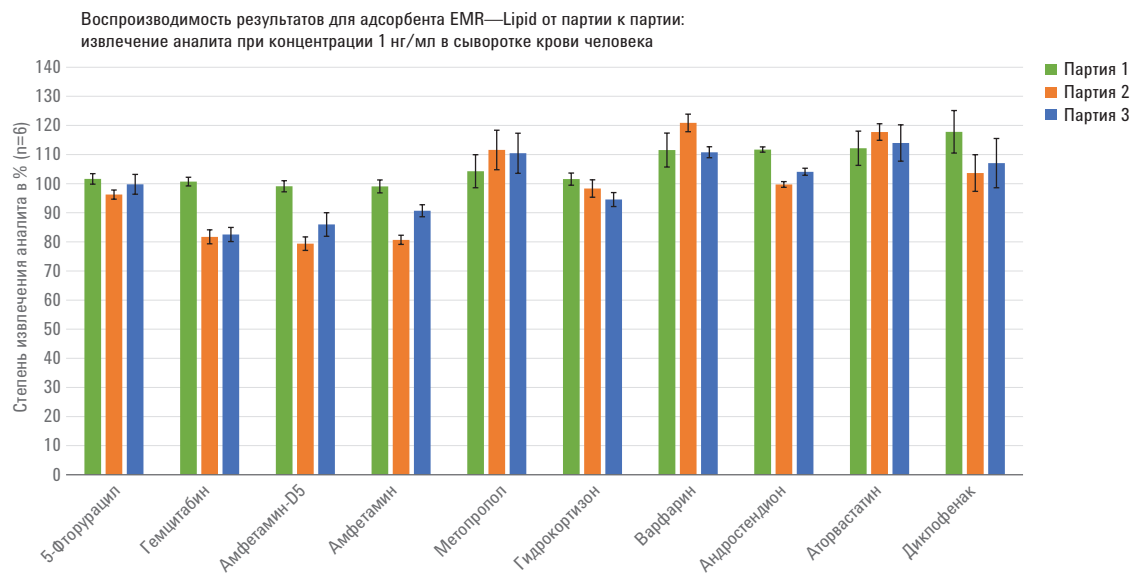


Рис. 7. Воспроизводимость результатов для адсорбента Agilent Captiva EMR—Lipid от партии к партии показана на примере извлечения аналита при концентрации 1 нг/мл в сыворотке крови человека.

## Выводы

Все методики пробоподготовки с помощью осаждения белков с последующей очисткой с использованием Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal—Lipid были верифицированы для количественного определения девяти репрезентативных лекарственных соединений в сыворотке крови человека. Трехдневные циклы анализа точности и воспроизводимости подтверждают, что метод Captiva EMR—Lipid обеспечивает превосходный динамический диапазон и линейность калибровки по сравнению с одним только осаждением белков и предоставляет исключительную точность и воспроизводимость анализов, проведенных в один день и в разные дни. Пробы после осаждения одних только белков содержат липиды, которые снижают чувствительность аналитической методики и делают невозможной ее верификацию по причине низкой точности калибровочной кривой. Исследование постколоночной инфузии стандартов продемонстрировало, что подавление сигнала ионами матрицы существенно сокращается по сравнению с одним только осаждением белков и осаждением белков с последующей очисткой с помощью альтернативных продуктов для удаления липидов. Селективный адсорбент липидов обеспечивает чистоту матрицы при отсутствии нежелательного удерживания аналитов и повышает надежность методики, что подтверждено превосходными количественными результатами. Очищенная матрица потенциально позволяет использовать аналог ВС или даже несоответствующий по структуре ВС вместо дорогостоящего меченного стабильным изотопом ВС, упрощая верификацию методики и делая анализ проб экономически более выгодным. Уникальное химическое строение адсорбента также позволяет осуществлять удаление липидов для других типов проб сложного состава. Это делает данный подход перспективным для решения других прикладных задач, например, определения соединений различных классов в мясных и других пищевых продуктах.

## Литература

1. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США, *Руководство по валидации промышленных биоаналитических методов* **2001**.
2. Билда, К. (Bylda, C.); Тиле, Р. (Thiele, R.) Последние достижения в технике пробоподготовки, позволяющие преодолеть трудности, возникающие в ходе количественного анализа молекул малого размера в биологических жидкостях при помощи ВЭЖХ/МС-МС. *The Analyst* **2014**, *139*, 2265–2276.
3. Ванхонакер, Г. (Vanhoenacker, G.) и др. Аналитический метод твердофазной экстракции и жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии для определения 2-гидрокси-4-метоксибензофенона и его метаболитов в моче и сперме человека. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, 831–843.
4. Малвана, Д.Е. (Mulvana, D.E.). Главные проблемы обеспечения качества данных при разработке биоаналитических методов ВЭЖХ-МС. *Bioanalysis* **2010**, *2*, 1051–1072.
5. Микопулос, Ф. (Michopoulos, F.) и др. Методы экстракции для удаления фосфолипидов и прочих эндогенных материалов из биологических жидкостей. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 2747–2755.
6. Жао, Л. (Zhao, L.); Лукас, Д. (Lucas, D.) Эффективность очистки матрицы биологических жидкостей с помощью Captiva EMR—Lipid. *Рекомендация по применению компании Agilent Technologies*, номер публикации 5991-8006EN, **2017**.
7. Бонфильо, Р. (Bonfiglio, R.) и др. Влияния методов пробоподготовки на колебания отклика при ионизации электрораспылением для модельных лекарственных соединений. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 1175–1185.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Только для исследовательских целей.  
Не для использования в диагностических процедурах.

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc. 2017  
Напечатано в США 26 июля 2017 г.  
5991-8007RU



**Agilent Technologies**