

# Использование продуктов Agilent Bond Elut Plexa для снижения ионной супрессии и улучшения чувствительности жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МС)

## Методические рекомендации

Фармацевтические средства и дженерики с малой молекулярной массой

### Автор

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

### Аннотация

В отличие от других продуктов для ТФЭ, использование полимерных сорбентов Agilent Bond Elut Plexa снижает ионную супрессию, обеспечивая лучшую чувствительность, низкие пределы обнаружения и пределы количественного определения. При экстрагировании бета-блокаторов достигаются высокие коэффициенты корреляции и точность определения содержаний при низких относительных стандартных отклонениях (% RSD).

### Введение

Ионная супрессия часто осложняет проведение биоанализов методом ЖХ-МС, приводя к занижению определяемых содержаний и неточности результатов, а также вызывает увеличение затрат и времени на ремонт прибора. При работе с биологическими образцами невозможно совершенно исключить ионную супрессию. Однако, если возможно, ее нужно избегать.

В отличие от продуктов-конкурентов, имеющих амидные остатки на поверхности сорбента, Agilent Bond Elut Plexa имеет гидроксигированную поверхность. Наличие амидных остатков может приводить к усилению взаимодействия между сорбентом для ТФЭ и эндогенными веществами биологических проб, что может непосредственно приводить к ионной супрессии в ходе биоанализа. Благодаря гидроксигированной поверхности использование Bond Elut Plexa уменьшает взаимодействие между сорбентом и эндогенными веществами в биологических образцах, повышая чувствительность. В данном примере мы представляем очевидные доказательства того, что при использовании монодисперсного полимерного сорбента Bond Elut Plexa для ТФЭ ионная супрессия уменьшается, а чувствительность повышается. Пробой послужила плазма крови человека с добавкой бета-блокаторов.



**Agilent Technologies**

## Вещества и методики

### Реактивы и растворы для ТФЭ

2%-й водный раствор аммиака	Развести 20 мкл разбавленного $\text{NH}_4\text{OH}$ в 1 мл $\text{H}_2\text{O}$
Метанол (MeOH)	степень чистоты ч.д.а. или выше
5%-й метанол	Развести 50 мкл метанола в 1 мл $\text{H}_2\text{O}$
Метанол и ацетонитрил в соотношении 50:50	смешать 1 мл метанола с 1 мл ацетонитрила

### Методика ТФЭ

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

Продукты для ТФЭ	96-луночный планшет Bond Elut Plexa компании Agilent (10 мг) (№ по кат. A4969010) Сравнимый 96-луночный планшет W (10 мг) Сравнимый 96-луночный планшет Р (10 мг)
Проба	100 мкл плазмы крови человека <sup>1</sup>
Предварительная обработка	Развести в 300 мкл 2% водного раствора аммиака
Условия	1. 500 мкл метанола 2. 500 мкл воды
Загрузка предварительной подготовки	400 мкл пробы, разведенной во время (фактическое количество плазмы — 100 мкл).
Промывка	500 мкл 5% метанола
Элюирование	Дважды по 250 мкл раствора ацетонитрила в метаноле в соотношении 50:50

## Постановка эксперимента

Для сравнения ионной супрессии осуществляли непрерывный ввод смеси лекарственных соединений (50 нг/мл) с помощью шприцевого насоса со скоростью 20 мкл/мин. При этом вводили холостую пробу плазмы. Холостые пробы плазмы были подготовлены с помощью продуктов Bond Elut Plexa компании Agilent и двух продуктов-конкурентов при использовании методик ТФЭ, описанных выше. Отслеживание содержания липидов в ходе анализа осуществляли на основании масс-спектрального перехода  $184 \rightarrow 184 m/z$ . На рис.1 показана постановка эксперимента.

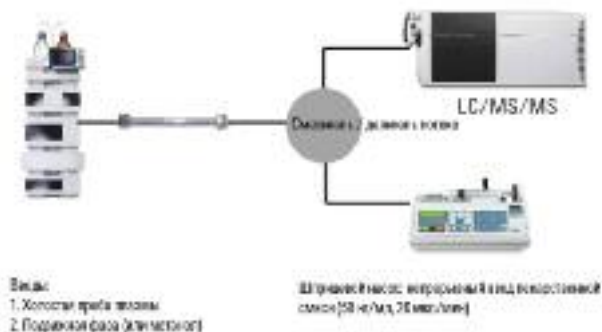


Рис. 1. Схематическое изображение постановки эксперимента сравнения ионной супрессии.

<sup>1</sup>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.

## Условия ВЭЖХ

Колонка	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 мм Ч 5,0 мм, 2,7 мкм (№ по кат. 699775-902)	
Прибор	жидкостный хромато-масс-спектрометр Agilent 1260 Infinity	
Подвижная фаза А	0,1% водный раствор муравьиной кислоты	
Подвижная фаза В	0,1 % 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)	
	ионизация распылением в электрическом поле в режиме положительных ионов с использованием технологии термоградиентной фокусировки JetStream	
Температура газа	350 °С	
Поток газа	10 л/мин	
Давление в распылителе	2,4 бар (35 фунтов на кв. дюйм)	
Температура вспомогательного периферийного газа	400 °С	
Скорость потока вспомогательного периферийного газа	12 л/мин	
Потенциал на капилляре	4000 В	
Пробы		

Бета-блокатор	pKa	log P	МС-МС переход	Энергия соударений	Напряжение на фрагменторе
Ацебутолол	9,40	1,71	337,2 и 116,1	20	128
Надолол	9,67	0,81	310,2 и 254,1	12	92
Атенолол	9,60	0,16	267,2 и 190,1	12	92
Пропранолол	9,42	3,48	260,2 и 116,2	16	92
Пиндолол	9,25	1,75	249,2 и 116,1	12	92
Метопролол (внутренний стандарт)	9,70	1,90	268,2 и 116,2	16	92

## Результаты и обсуждение

По всем анализам были получены хорошие результаты разделения и хорошее удерживание, что отражено на рис. 2. На рис. 3 показано, что снижение ионной супрессии обеспечило более высокую чувствительность. На рисунке показано совмещение хроматограмм по ионному току для надолола, полученных с тремя продуктами для ТФЭ. Во всех случаях вводили холостую пробу и одновременно осуществляли непрерывное введение смеси лекарственных средств. При использовании Bond Elut Plexa сигнал был выше, чем для других продуктов в течение почти всего анализа. На рис. 4 показано совмещение хроматограмм по ионному току иона-продукта для перехода  $184 \rightarrow 184 m/z$  полученных с тремя продуктами для ТФЭ. Полученные данные демонстрируют, что при использовании сорбента Bond Elut Plexa ионная супрессия меньше, чем у других продуктов для ТФЭ.

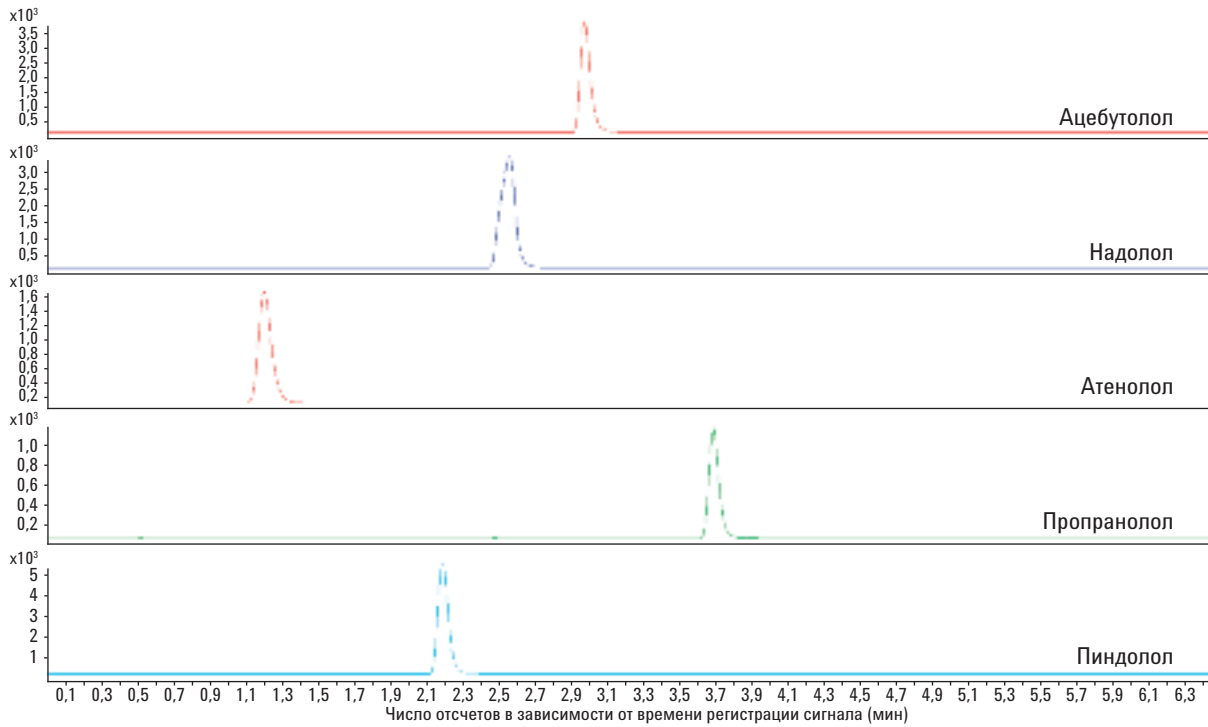


Рис. 2. Хроматограмма по ионному току для пробы плазмы с добавкой анализируемых соединений, обработанной с помощью продуктов Bond Elut Plexa компании Agilent (5 нг/мл каждого аналита).

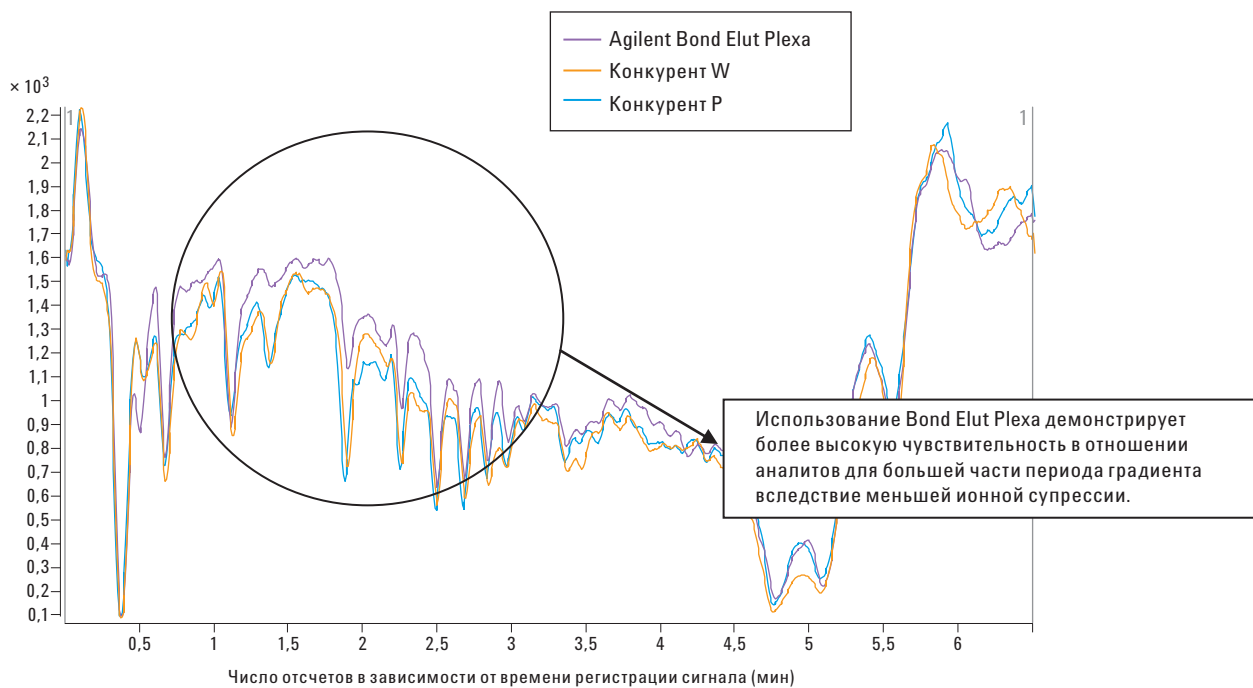


Рис. 3. Совмещенные сигналы надолола из опытов с разными продуктами для ТФЭ, полученные при одновременном введении холостых проб плазмы и непрерывном вводе смеси лекарственных веществ, демонстрирует превосходство сорбента Agilent Bond Elut Plexa.

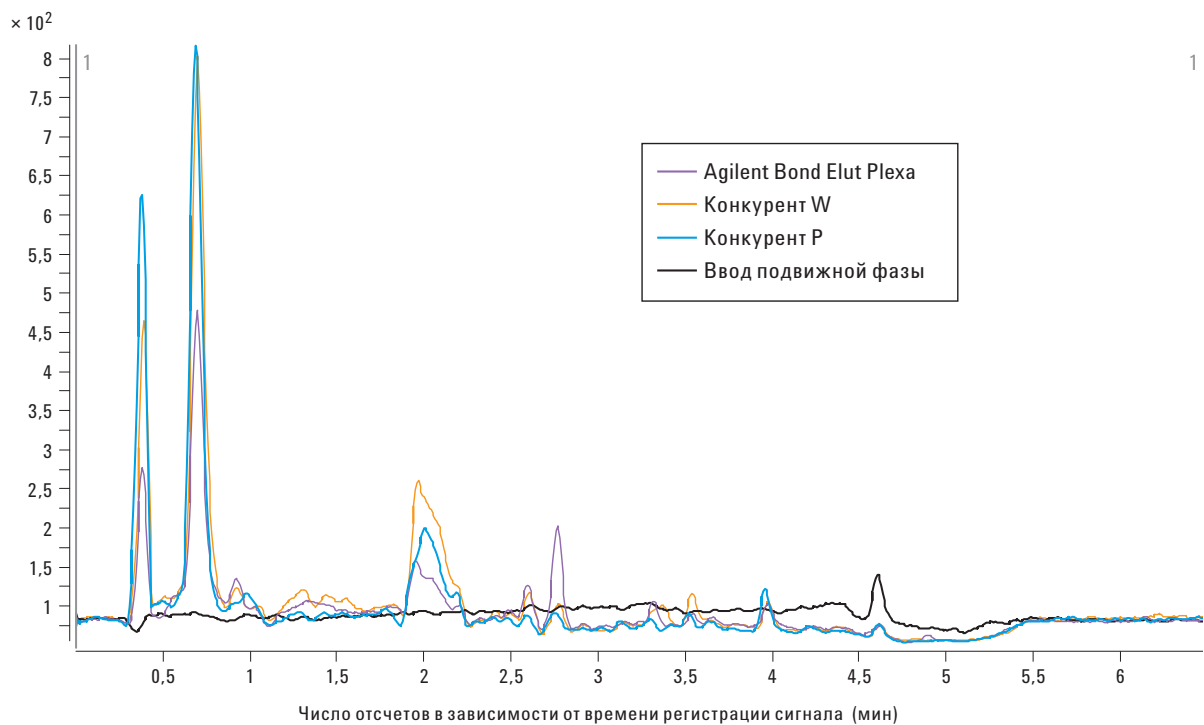


Рис. 4. Отслеживание содержания липидов при введении холостой пробы плазмы с помощью масс-спектрального перехода 184 → 184 m/z, показывающее снижение ионной супрессии при использовании продуктов Agilent Bond Elut Plexa.

Использование Bond Elut Plexa обеспечивает превосходные пределы обнаружения (уровень обнаружения  $\leq 0,05$  нг/мл) и пределы количественного определения ( $\leq 0,5$  нг/мл). Исследование точности воспроизведения содержания проводилось при трех разных уровнях концентраций (низкой, средней и высокой,  $n = 6$ ), и собранные в табл. 1 данные позволяют сделать вывод о высокой точности определяемых содержаний и низком относительном стандартном отклонении результатов (% RSD). Калибровочные кривые построены по девяти точкам (в диапазоне 0,01 – 100 нг/мл), при этом для всех соединений наблюдается достаточно хорошая линейность с коэффициентами корреляции  $R^2 \geq 0,995$  (рис. 5).

Таблица 1. Результаты исследования точности воспроизведения содержаний с использованием Agilent Bond Elut Plexa

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 эталонного значения	RSD (%)	Найденное содержание, % от эталонного значения	RSD (%)	Найденное содержание, % от эталонного значения	RSD (%)		
Ацебутолол	9,40	1,71	0,01	0,05	79,3	0,5	84,9	0,7	97,0	0,4	0,996
Надолол	9,67	0,81	0,01	0,05	98,5	0,8	94,7	1,4	108,1	0,8	0,997
Атенолол	9,60	0,16	0,05	0,5	119,7	2,9	104,0	2,5	109,0	4,5	1,000
Пропранолол	9,42	3,48	0,05	0,5	106,2	3,7	109,9	7,3	126,9	9,7	0,995
Пиндолол	9,25	1,75	0,01	0,05	111,6	1,3	106,0	3,0	115,1	2,8	0,998

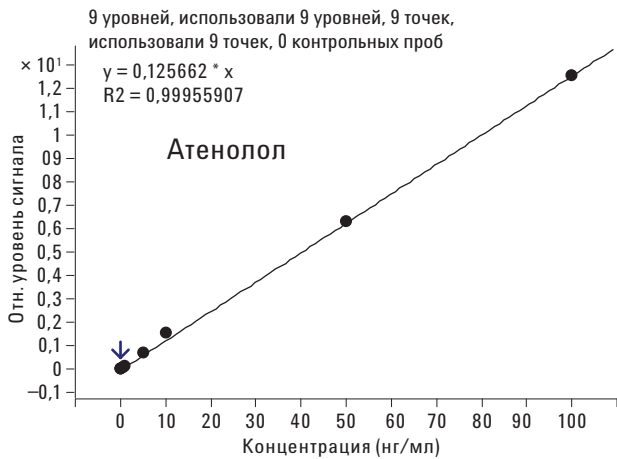
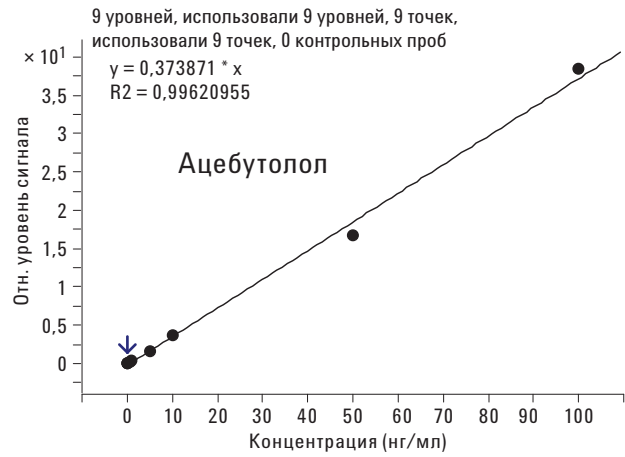
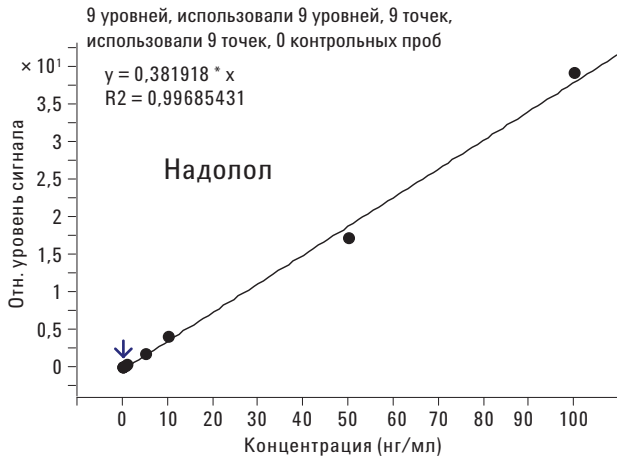
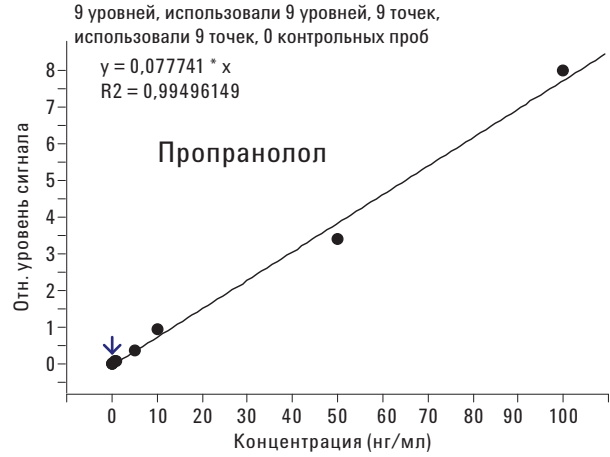
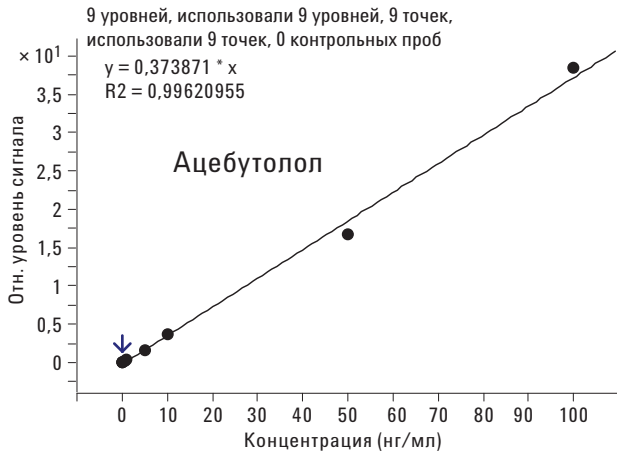


Рис. 5. Калибровочные кривые для пяти бета-блокаторов, построенные по девяти точкам (при концентрациях — 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50 и 100 нг/мл).

## Выводы

По сравнению с другими продуктами для ТФЭ использование сорбента Agilent Bond Elut Plexa снижает ионную супрессию, что, в свою очередь, обеспечивает лучшую чувствительность. Лучшая чувствительность обеспечивает низкие уровни обнаружения (0,01 – 0,05 нг/мл) и пределы количественного определения (0,05 – 0,5 нг/мл). Кроме этого достигаются высокие коэффициенты корреляции ( $R^2 \geq 0,995$ ) и хорошая точность воспроизведения содержаний при очень низком относительном стандартном отклонении результатов.

## Дополнительная информация

Дополнительную информацию о продуктах и услугах нашей компании см. на веб-сайт [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://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, описани и спецификации в настоящем документе могут быть изменен без предупреждения.

компания Agilent Technologies, Inc., 2011  
Отпечатано в США 1 декабря 2013 г  
5990-8388RU



**Agilent Technologies**