

# Одновременное определение лекарственных веществ в плазме крови человека с использованием ВЭЖХ-МС-МС

## Авторы

Сривидя Каиласам  
Agilent Technologies India Pvt. Ltd.,  
Бангалор, Индия

Это примечание по применению методики для клинических исследований предназначено только для использования в ходе исследований. Не для клинических исследований.

## Резюме

В настоящей статье описано одновременное определение ателолола, амлодипина, клонидина, эналаприла, лизиноприла, фуросемида, гидрохлоротиазида, лозартана, валсартана, телмисартана и канренона (активный метаболит спиронолактона) в плазме крови человека методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС-МС) для клинического исследования. Параметры масс-спектрометрии были оптимизированы в течение одного дня с применением программного обеспечения (ПО) MassHunter Optimizer, которое определяет наиболее распространенные ионы-продукты (по интенсивности пиков в масс-спектре) и наиболее подходящие значения напряжения на фрагментационной ячейке и энергии соударений, необходимые для получения этих ионов-продуктов. Для выполнения экстракции одиннадцати лекарственных веществ была использована простая методика пробоподготовки с осаждением белков из 100 мкл плазмы. Получены линейные калибровочные графики в диапазоне концентраций 5–5000 нг/мл для всех целевых веществ в плазме, которые характеризуются хорошей воспроизводимостью.

## Введение

Благодаря высокой чувствительности и специфичности метод ВЭЖХ-МС-МС является предпочтительным для анализа экзогенных веществ в биологических жидкостях. В этой статье описывается одновременный анализ 11 лекарственных веществ в плазме человека с использованием тройного квадрупольного детектора “Аджилент” серии 6410В для ВЭЖХ, сопряженного с ЖХ 1260 Infinity компании “Аджилент”.



**Agilent Technologies**  
Компания “Аджилент Текнолоджиз”

## Оборудование

Система для ВЭЖХ-МС-МС "Аджилент":

- Двухканальный насос "Аджилент" 1260 Infinity (G1312B)
- Дегазатор "Аджилент" 1260 Infinity (G1379B)
- Автосамплер "Аджилент" 1260 Infinity (G1367D)
- Термостат "Аджилент" 1260 Infinity (G1330B)
- Термостат колоночного отделения "Аджилент" 1260 Infinity (G1316A)
- Трехквadrupольный ЖХ-МС "Аджилент" 6410 G6410B
- Программное обеспечение
  - MassHunter B.03.01 (Сбор данных и их количественный анализ)
  - MassHunter B.04.00
  - количественный анализ

## Стандартные вещества и реактивы

Плазма крови человека (лиофилизированная) и стандартные образцы лекарственных веществ: ателолол, амлодипин, клонидин, эналаприл, лизиноприл, фуросемид, гидрохлоротиазид и телмисартан производства компании Sigma-Aldrich. Лозартан, валсартан и канренон производства компании Varda Biotech. Ацетонитрил, метанол и муравьиная кислота компании Fluka.

## Приготовление смесей стандартных образцов

Исходные растворы каждого из стандартных образцов готовили растворением вещества в метаноле с получением концентрации 500 мкг/мл. Эти исходные стандартные растворы объединяли и разводили в смеси вода/метанол (9:1 о/о) для получения водных растворов смеси стандартных образцов с концентрацией 5000 нг/мл и 10000 нг/мл, соответственно. Эти два раствора смеси стандартных образцов последовательно разводили в растворе вода/метанол 9:1 (о/о) для получения водных растворов смесей стандартных образцов с концентрациями 5, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 и 5000 нг/мл. Этот диапазон концентраций включает в себя все ожидаемые значения для лекарственных веществ в испытуемых пробах.

## Приготовление холостых проб и стандартных растворов для калибровки

Чтобы приготовить стандартные растворы для калибровки, в микроцентрифужных пробирках смешивали 100 мкл плазмы человека и 100 мкл водных растворов смеси стандартных образцов лекарственных веществ. Концентрация каждого из анализируемых веществ в водных смесях находилась в диапазоне 5–5000 нг/мл. Для приготовления

холостого раствора плазмы к 100 мкл плазмы добавили 100 мкл раствора вода: метанол 9:1 (о/о). Все пробы плазмы обрабатывали 500 мкл холодного ацетонитрила и далее перемешивали в течение 1 минуты, центрифугировали и перенесли по 695 мкл надосадочной жидкости в другие микроцентрифужные пробирки и высушивали в вакууме. Осадки суспендировали в 20 мкл раствора метанол:вода 1:1 (о/о) и далее разводили до 100 мкл водой.

## Хроматографические условия

<b>Подвижные фазы</b>	компонент А: 0,1% водный раствор муравьиной кислоты компонент В: 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле	
<b>Скорость потока</b>	0,35 мл/мин	
<b>Градиент</b>	<b>Время (мин)</b>	<b>% В</b>
	0,0	6
	2,0	18
	7,0	98
	7,5	98
	8,0	6
	9,0	6
	Время остановки: 9,0 мин	
	Время восстановления колонки после анализа: 1,0 мин	
<b>Объем пробы</b>	10 мкл	
<b>Промывка иглы</b>	промывание в течение 10 с через промывочное отверстие 1:1 раствором метанол:вода с 0,1% муравьиной кислотой	
<b>Колонка</b>	ZORBAX RRHT Eclipse Plus компании "Аджилент" для скоростной хроматографии с повышенной пропускной способностью (RRHT) — C18 2,1 X 50 мм, 1,8 мкм (каталожный номер 959741-902)	
<b>Температура колонки</b>	40 °С на обеих сторонах	

## Масс-спектрометрические условия

### Параметры источника ионизации:

<b>Режим ионизации</b>	ионизация электрораспылением (ИЭР) (+/-); переключение полярности
<b>Температура газа</b>	325 °С
<b>Расход газа</b>	10 л/мин
<b>Давление в распылителе</b>	40 фунтов на кв. дюйм
<b>Напряжение на входе в капилляр</b>	4000 В (+) и 3500 В (-)
<b>Напряжение умножителя (Delta EMV)</b>	300 В (+) и 300 В (-)

**MRM-переходы (MRM — мониторинг множественных реакций):**

Исходный ион ( <i>m/z</i> )/ (Режим ионизации)	Ион-продукт ( <i>m/z</i> )	Напряжение на фрагментационной ячейке (В)	Энергия соударения (эВ)	Время переключения (мс)
Телмисартан 515,2/ (+)	497,3 (Качеств.)	160	40	20
	276,1 (Количеств.)	155	50	20
Валсартан 436,2/ (+)	235 (Качеств.)	98	14	20
	291,1 (Количеств.)	98	14	20
Лозартан 423,2/ (+)	206,6 (Качеств.)	120	38	20
	180 (Количеств.)	120	42	20
Амлодипин 409,2/ (+)	294,1 (Качеств.)	90	9	20
	238,2 (Количеств.)	95	9	20
Лизиноприл 406,2/ (+)	245,9 (Качеств.)	136	20	20
	84,1 (Количеств.)	136	30	20
Эналаприл 377,2/ (+)	234,1 (Качеств.)	106	6	20
	303,1 (Количеств.)	106	14	20
Канренон 341,2/ (+)	107,1 (Количеств.)	150	30	20
	190 (Качеств.)	120	14	20
Атенолол 267,2/ (+)	145 (Количеств.)	120	26	20
	213,2 (Качеств.)	125	25	20
Клонидин 230/ (+)	44,1 (Количеств.)	130	30	20
	268,9 (Количеств.)	130	10	20
Гидрохлоротиазид 296/ (-)	204,7 (Качеств.)	130	15	20
	Фуросемид 329,3/ (-)	205 (Количеств.)	105	10

**Результаты**

Для всех целевых соединений было оптимизировано хроматографическое разделение, селективность и чувствительности обеспечивали путем измерения каждого из анализируемых веществ в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). MassHunter Optimizer был использован для определения наиболее частых MRM-переходов для всех целевых соединений. Это ПО также обеспечивает два важных масс-спектрометрических параметра, связанных с выбранными MRM-переходами, — значения напряжения на фрагментационной ячейке и энергии соударений. Таким образом, масс-спектральные характеристики могут быть без труда оптимизированы в течение одного дня. Использовали единый набор параметров

источника ионов с электрораспылением (ИЭР, ESI) для всех целевых соединений.

Девять из одиннадцати анализируемых веществ продемонстрировали хороший отклик в ходе анализа методом ИЭР в режиме регистрации положительных ионов, в то время как два других анализируемых вещества, гидрохлоротиазид и фуросемид, продемонстрировали лучшие отклики в ходе анализа методом ИЭР в режиме регистрации отрицательных ионов. Анализ ионизации соединений в разных режимах может быть выполнен за один цикл благодаря функции быстрого переключения на другую полярность тройного квадрупольного ЖХ-МС детектора “Аджилент” 6410В. Для выполнения экстракции проб был использован простой метод осаждения белков. Этот метод является удобным

для использования в клинических исследованиях и позволяет быстро получать результаты. Было получено оптимальное разделение выбранных соединений при длительности анализа менее чем 10 минут (**Рисунок 1**).

Все калибровочные графики строили с выполнением линейной аппроксимации и с использованием взвешенных значений (1/x). Был получен линейный динамический диапазон 5–5000 нг/мл для всех анализируемых веществ со значением R<sup>2</sup> более чем 0,9. На **Рисунке 2** представлены четыре типовых калибровочных графика. Спиринолактон превращается в растворе в активный метаболит канренон, который и использовали для построения калибровочных графиков.

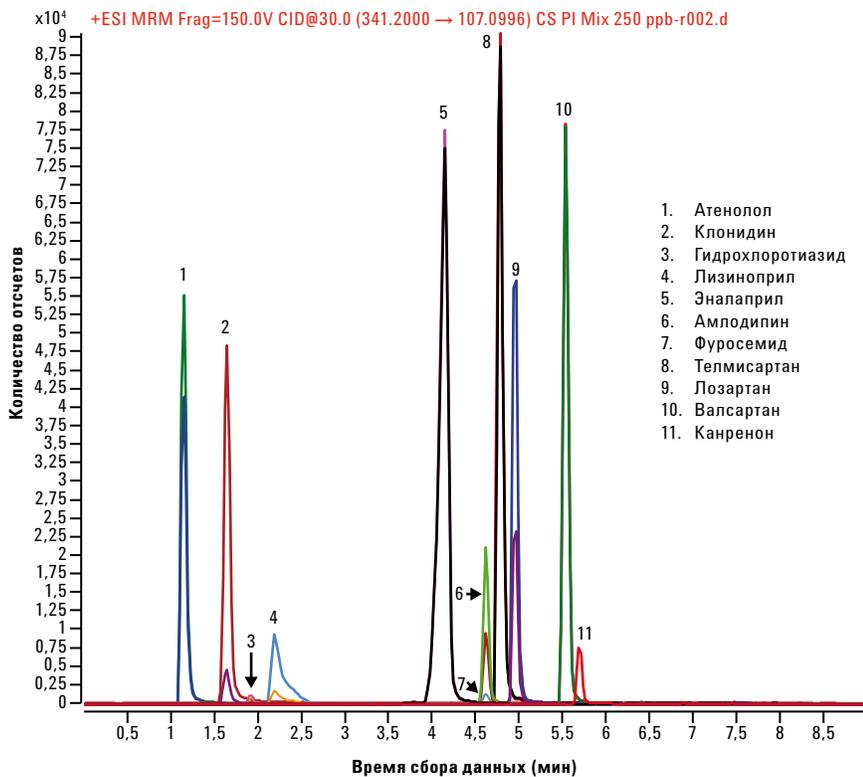


Рисунок 1. MRM хроматограмма 250 нг/мл калибровочного стандарта.

## Выводы

В этой статье описана разработанная чувствительная и селективная ВЭЖХ-МС-МС методика для одновременного определения некоторых лекарственных веществ в плазме человека с использованием тройного квадрупольного ЖХ-МС детектора “Аджилент” серии 6410В, сопряженного с ЖХ 1260 Infinity компании “Аджилент”. Быструю разработку ВЭЖХ-МС-МС метода выполняли с применением ПО MassHunter Optimizer, которое определяло наиболее распространенные MRM-переходы и соответствующие им значения напряжения на фрагментационной ячейке и энергии соударений. Функция быстрого переключения на другую полярность масс-спектрометра позволяет выполнить анализ ионизации соединений в режимах регистрации, как положительных, так и отрицательных ионов, за один цикл. Для всех исследуемых соединений продемонстрировали хорошую воспроизводимость и большие линейные динамические диапазоны 5–5000 нг/мл.

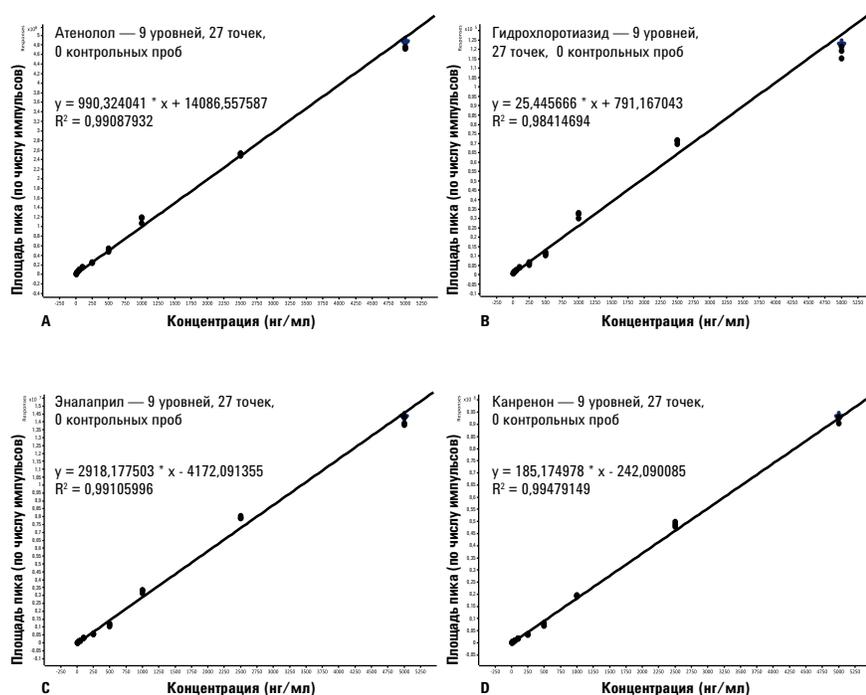


Рисунок 2. Калибровочные графики для: а) атенолола, б) гидрохлоротиазида, с) эналаприла и д) канренона

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

Настоящая информация предназначена только для использования в ходе исследований. Не для использования в ходе диагностических процедур. Информация, описания и технические характеристики в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

Компания “Аджилент Текнолоджиз” не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные с настоящим документом или являющиеся следствием ознакомления с ним, его получения или использования.

© Agilent Technologies, Inc. 2011  
 Оригинал напечатан в США 10 мая 2011 г.  
 5990-7334RU



**Agilent Technologies**  
 Компания “Аджилент Текнолоджиз”