

# Определение фармацевтических веществ в цельной крови с применением мини-экстракции для пробоподготовки и использованием Poroshell 120

## Методическая информация

Фармацевтические вещества с малым размером молекул и дженерики

### Автор

Джоан Стивенс  
Agilent Technologies, Inc.

### Резюме

Удобный аналитический метод определения фармацевтических веществ различных терапевтических групп в образцах цельной крови заключается в добавлении ацетонитрила и солей к небольшому количеству крови. Смесь встряхивается и центрифугируется для экстракции/разделения, при этом из образца удаляются белки и вода. Аликвота органического слоя очищается путем дисперсионной твердофазной экстракции (ТФЭ) с использованием сорбентов и солей для удаления эндогенных компонентов проб. Аналиты затем отделяются от меченых образцов с выходом более 80 % и ОСО менее 10 %. Эти значения действительны для большого количества веществ. Этот подход, заключающийся в мини-экстракции из цельной крови, обеспечивает успешное разделение различных фармацевтических веществ с предельным минимальным определяемым значением 10 нг/мл. Метод быстрый, простой, недорогой и эффективный.



**Agilent Technologies**

## Введение

Определение фармацевтических веществ в биологических матрицах обычно используется при анализах ADME (DMPK), клинических анализах и судебно-медицинской экспертизе. Основные используемые методы анализов — иммунохимический анализ, ЖХ и ГХ. Масс-спектральные хроматографические методы являются первым выбором для различных применений, благодаря их гибкости, специфичности, чувствительности, возможности качественной и количественной оценки. Анализ фармацевтических веществ в биологических пробах требует пробоподготовки, которая может варьировать от простого осаждения белков до более сложной твердофазной экстракции (ТФЭ). Для определения нескольких классов фармацевтических веществ в биологических образцах необходимо выполнять пробоподготовку по классическому варианту. Для этой цели предназначены полимерные или смешанные ТФЭ-сорбенты, которые позволяют разделить кислотные, нейтральные и основные препараты по гидрофобности и/или за счет ионно-обменных взаимодействий, но всегда можно найти и другие быстрые и недорогие для внедрения методы пробоподготовки.

Ранее используемые методы обеспечивали анализ наличия остатков пестицидов в пище. Они называются QuEChERS (быстрый, простой, дешевый, эффективный, надежный и безопасный подход к пробоподготовке) [1]. Авторы сообщают о выдающихся значениях извлечения для широкого диапазона пестицидов. С начала применения было написано много статей, где говорилось об использовании

QuEChERS для анализа большого перечня веществ, включая антибиотики [2], токсины [3], загрязняющие вещества [4] и фармацевтические вещества [5].

В этой статье описывается расширенная работа, представленная Плесслом и соавт. [5] для определения наличия фармацевтических веществ в цельной крови с применением измененной процедуры мини-экстракции с анализом ЖХ/МС/МС. В данной работе представлены эксперименты, в которых использовалась цельная кровь человека, содержащая в качестве антикоагулянта ЭДТА или цитрат. Оценка проб проводилась с применением солей для экстракции с буфером или без него по методике QuEChERS, предписанной AOAC 2007.01 и EN 15662. Также оценивался вариант с применением на первом этапе (экстракция/разделение) ацетонитрила (растворителя для экстракции). Были проведены эксперименты с девятью различными фармацевтическими веществами (лидокаин, трамадол, амитриптилин, бипериден, оксазепам, лоразепам, хлопромазин, дилтиазем и налоксон) с широким диапазоном гидрофобности и констант диссоциации (Таблица 1). Колонка Agilent Poroshell 120 хорошо подходит для такого анализа, так как имеет размеры частиц 2 мкм, что лучше для проб сложного состава по сравнению с колонкой с размером частиц менее 2 мкм. Poroshell 120 имеет такой перенос массы, что работает очень схоже с колонкой для ЖХ с размером частиц менее 2 мкм, но без характерного для последней высокого обратного давления. Эффективный перенос массы соответствует более быстрому анализу и большей производительности при оптимальном разрешении.

Таблица 1. Характеристики исследуемых фармакологических веществ

Соединение	Номер CAS	Log P	pKa	Терапевтическое назначение
Лидокаин	137-58-6	2,4	8,01	Местный анестетик, антиаритмическое средство
Трамадол	27203-92-5	2,5	9,41	Анальгетик
Амитриптилин	50-48-6	4,92	9,4	Антидепрессант
Бипериден	514-65-8	4,0	10,8	Антихолинергическое средство
Оксазепам	604-75-1	2,23	1,7, 11,3	Седативное средство
Лоразепам	846-49-1	2,47	1,3, 11,5	Антидепрессант
Хлорпромазин	50-53-3	5,18	9,3	Нейролептическое средство
Дилтиазем	42399-41-7	3,63	7,7	Блокатор кальциевых каналов
Налоксон	465-65-6	1,45	7,9	Антагонист опиоидных рецепторов
Нортриптилин (IS)	72-69-5	5,65	9,7	

## Экспериментальная часть

Все реагенты и растворители для ВЭЖХ имели аналитическую степень чистоты. Соединения закупались в корпорации Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

Базовый раствор 1 М ацетата аммония ( $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ) рН5 был приготовлен путем растворения 19,27 г порошка  $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$  в 250 мл воды Milli-Q. Добавлением уксусной кислоты кислотность раствора приводили к рН 5 под контролем рН-метра. Раствор хранился при температуре 4 °С. Раствор метанола в воде (20:80) получали смешением 200 мл метанола и 800 мл воды Milli-Q. Затем, для получения 5мМ раствора ацетата аммония в метаноле, в него добавляли 5 мл базового 1М раствора ацетата аммония с рН 5. 5 мМ раствор ацетата аммония в ацетонитриле был приготовлен путем добавления 5 мл 1 М базового раствора  $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$  с рН 5 к 1 л ацетонитрила с последующей ультразвуковой обработкой.

Стандартные растворы и растворы внутренних стандартов (2,0 мг/мл) были приготовлены в метаноле и хранились при температуре –20 °С. Ежедневно готовился свежий стандарт для контроля качества 5,0 мкг/мл в растворе ацетонитрила с водой 1:1 (0,1 % муравьиной кислоты). Для подготовки калибровочных кривых в холостом экстракте матрикса с соответствующим разведением готовился стандартный раствор 0,5 и 5,0 мкг/мл в смеси ацетонитрила с водой 1:1 (0,1 % муравьиной кислоты). Для внутреннего стандарта (IS) использовался нортриптилин пять мкг/мл в смеси ацетонитрила с водой 1:1 (0,1 % муравьиной кислоты).

## Оборудование

- ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity LC с диодной матрицей
- Трехквadrupольная система ЖХ/МС Agilent 6460 с ионизацией электрораспылением
- Набор для экстракции Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC (каталожный номер 5982-6755)
- Набор для экстракции Bond Elut QuEChERS EN (каталожный номер 5982-6650)
- Безбуферный набор для экстракции Bond Elut QuEChERS (каталожный номер 5982-6550)
- Набор для дисперсивной ТФЭ Bond Elut QuEChERS AOAC для фруктов и овощей (каталожный номер 5982-5022)

- Набор для дисперсивной ТФЭ Bond Elut QuEChERS EN для фруктов и овощей (каталожный номер 5982-5021)
- Керамические гомогенизаторы Bond Elut (каталожный номер 5982-9312)
- Центрифуга Sorvall ST 16R (Thermo IEC, Майами, США)
- Микроцентрифуга Эппендорф 5415D (Brinkman Instruments, Вестбери, Нью-Йорк, США)
- Geno Grinder 2010 (SPEX CertiPrep, Inc., Метучен, Нью-Джерси, США)
- Вортекс для нескольких пробирок DVX 2500 (VWR International, Вестчестер, Пенсильвания, США)

## Условия проведения жидкостной хроматографии высокого давления

Колонка	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 100 мм, 2,7 мкм (каталожный номер 695775-902)
Скорость	0,4 мл/мин
Температура колонки	30 °С
Инъекция	10 мкл
Подвижная фаза	А. 5 мМ ацетата аммония с рН 5 в растворе метанола в воде 20:80 В. 5 мМ ацетата аммония с рН 5 в ацетонитриле
Промывка иглы	1:1:1:1 ACN:MeOH:IPA:H <sub>2</sub> O (0,2 % муравьиной кислоты)
Градиент	от 20 до 75% В более 5,5 мин

## Условия МС

Электроспрей	Режим положительной полярности
GT	300 °С
GF	7 л/мин
Распылитель	40 psi
SGT	400 °С
SFG	12 л/мин
Капилляры	3500 В
NV	500 В

Другие относящиеся к анализам условия МС приведены в таблице 2.

Таблица 2. Собранные прибором данные, использованные для анализа девяти препаратов с помощью ЖХ/МС/МС

Соединение	Каналы MRM (m/z)	Фрагментационная ячейка (В)	Энергия диссоциации (В)	RT (мин)	Дельта RT
Лидокаин	1) 235,18 > 86,1 2) 235,18 > 58,1	97	11 35	1,37	0,4
Трамадол	1) 264,2 > 58,1 2) 264,2 > 246,1	97	15 3	1,20	0,4
Амитриптилин	1) 278,2 > 117 2) 278,2 > 105	112	19 19	4,25	0,4
Бипериден	1) 312,23 > 98,1 2) 312,23 > 55,1	123	19 60	4,23	0,7
Оксазепам	1) 287,06 > 240,9 2) 287,06 > 268,9	112	19 7	3,99	0,4
Лоразепам	1) 321,02 > 274,9 2) 321,02 > 302,9	113	15 7	4,09	0,4
Хлорпромазин	1) 319,11 > 86,1 2) 319,11 > 58,1	112	15 43	4,63	0,4
Дилтиазем	1) 415,17 > 177,9 2) 415,17 > 149,9	128	19 43	3,73	0,4
Налоксон	1) 328,16 > 310 2) 328,16 > 212	123	15 39	0,82	0,4
Нортриптилин (IS)	1) 264,18 > 233 2) 264,18 > 91	97	7 19	4,17	0,4

## Общее описание процедуры

1. Добавить в пробирку для центрифуги 1 мл цельной крови.
2. Добавить соответствующий объем концентрированной смеси для стандартного раствора для получения смеси компонентов с концентрацией 25, 50 и 100 нг/мл.
3. Добавить 20 мкл базового раствора IS для концентрации 100 нг/мл (нортриптилин) и два керамических гомогенизатора.
4. Встряхнуть.
5. Добавить 2 мл раствора ацетонитрила (с кислотой или без нее), см. таблицу 3.
6. Встряхнуть.
7. Добавить предварительно смешанное количество (см. таблицу 3) солей для экстракции и энергично встряхнуть.
8. Центрифугировать при 5000 об/мин в течение 5 минут.
9. Переместить 1 мл экстракта в пробирку d-SPE (центрифужную пробирку объемом 2 мл) с 50 мг PSA и 150 мг MgSO<sub>4</sub> для очистки.
10. Встряхивать в течение 1 минуты.
11. Центрифугировать при 18 000 об/мин в течение 3 минут.
12. Переместить аликвоту экстракта объемом 200 мкл в вialу для ЖХ с 800 мкл воды.
13. Встряхнуть и провести анализ.

Вся серия экспериментов представлена в таблице 3. Для определения извлечения использовалась соответствующая пробам калибровочная кривая от 10 до 250 нг/мл.

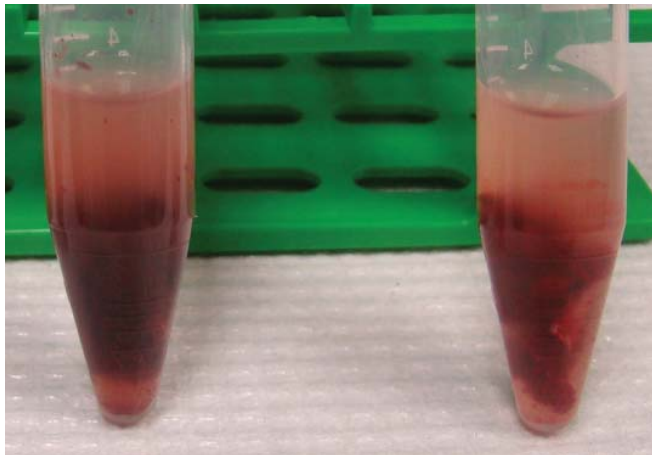
Таблица 3. Исследуемые серии условий Эксперимента

Проба (1 мл)	Растворитель для экстракции	Соли для экстракции (мг)	d-SPE	Наблюдения
WB	ACN	нет	нет	Проба: твердая масса
WB	ACN, 1 % AA	нет	нет	Проба: твердая масса
WB	ACN, 0,4 % FA	нет	нет	Проба: свободные частицы
WB	ACN, 0,4 % FA	Небуферизированный, 500	нет	Темный экстракт
WB	ACN, 0,4 % FA	АОАС 500	нет	Прозрачный экстракт
WB	ACN, 0,4 % FA	EN, 650	нет	Темный экстракт
WB	ACN, 0,4 % FA	Небуферизированный, 500	50 мг PSA, 150 мг MgSO <sub>4</sub>	Прозрачный экстракт
WB	ACN, 0,4 % FA	АОАС 500	50 мг PSA, 150 мг MgSO <sub>4</sub>	Прозрачный экстракт
WB	ACN, 0,4 % FA	EN, 650	25 мг PSA, 150 мг MgSO <sub>4</sub>	Прозрачный экстракт
WB	ACN, 0,4 % FA	EN, 650	50 мг PSA, 150 мг MgSO <sub>4</sub>	Прозрачный экстракт

WB = цельная кровь; ACN = ацетонитрил, AA = уксусная кислота; FA = муравьиная кислота, PSA = первично-вторичный амин, АОАС = MgSO<sub>4</sub> и ацетат натрия, EN = MgSO<sub>4</sub> и цитратные буферы, небуферизированный = MgSO<sub>4</sub> и хлорид натрия

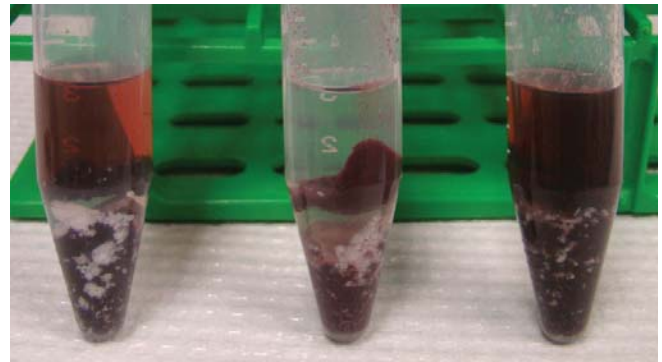
## Результаты и обсуждение

В результате Экспериментов было установлено, что использование ацетонитрила (0,4 % муравьиной кислоты) в качестве растворителя для экстракции приводит к лучшему, по сравнению с другими растворителями для экстракции, лизированию образцов, где образец превращался в твердую массу (см. рисунки 1 и 2). Визуально наиболее чистые экстракты были получены при использовании буферизированных АОАС солей (рисунок 3), которые применялись с d-SPE, содержащим 50 мг PSA 150 мг MgSO<sub>4</sub> для экстракции фармацевтических веществ из цельной крови (рисунок 4). Стадия использования d-SPE, по сути, обеспечивает полную очистку всех экстрагированных образцов, особенно для EN и небуферизированных экстрактов солей, в которых ранее обнаруживалось значительное остаточное количество эритроцитов.



A B

Рис. 1. Добавление ацетонитрила (A) или ацетонитрила (1 % уксусной кислоты) (B) к цельной крови, обычно используемые в методике QuEChERS растворители.



A B C

Рис. 3. После добавления ацетонитрила (0,4 % муравьиной кислоты), солей QuEChERS, взбалтывания и встряхивания.  
 A Метод EN с солями лимонной кислоты  
 B Метод AOAC с солями уксусной кислоты  
 C Метод с небуферизированными хлоридами

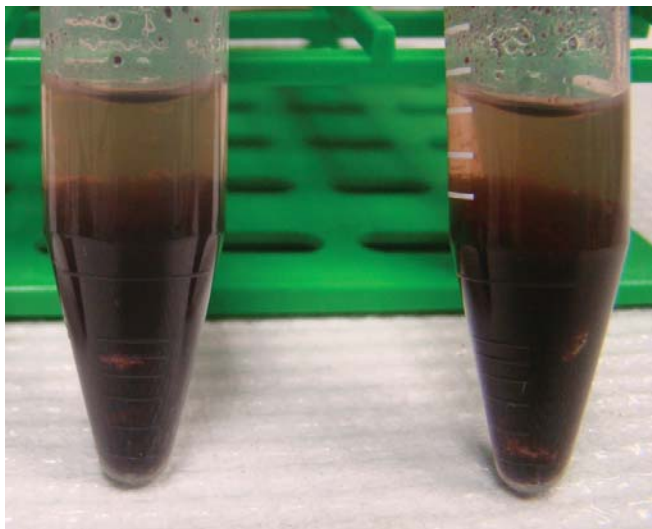


Рис. 2. Добавление ацетонитрила (0,4 % муравьиной кислоты) к цельной крови.



A B C D

Рис. 4. Экстракт после добавления d-SPE для очистки, содержащего 150 мг  $MgSO_4$  и различные количества PSA.  
 A EN соли лимонной кислоты и EN d-SPE 25 мг PSA  
 B EN соли лимонной кислоты и AOAC d-SPE 50 мг PSA  
 C AOAC соли уксусной кислоты и AOAC d-SPE 50 мг PSA  
 D Небуферизированные соли хлорной кислоты и AOAC d-SPE 50 мг PSA

Процедура мини-экстракции основана на принципах методологии QuEChERS. Он является альтернативой более сложным способам, обеспечивая простую пробоподготовку для сложных образцов, таких как цельная кровь. Этот тип пробоподготовки прекрасно дополняет высокую селективность режима мониторинга множественных реакций (MRM) ЖХ/МС/МС. Полученный экстракт цельной крови был чистым и не имел примесей, что указывает на отсутствие влияния чистого экстракта цельной крови на целевые вещества. На рис. 5 показана хроматограмма образца цельной крови 10 нг/мл после проведения процедуры мини-экстракции.

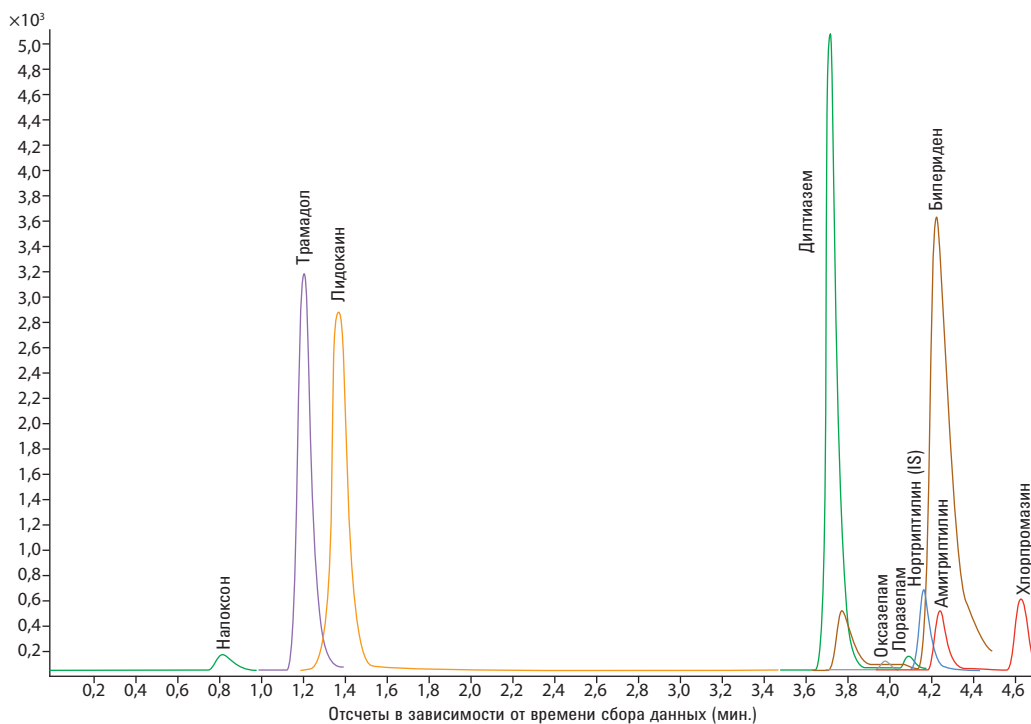


Рис. 5. Хроматограммы ЖХ/МС/МС меченого образца цельной крови с концентрацией 10 нг/мл после мини-экстракции, АОАС соли уксусной кислоты и АОАС d-SPE с 50 мг PSA и 150 мг MgSO<sub>4</sub>.

## Линейность и предел количественной оценки (LOQ)

Оценка диапазона линейной калибровки проводилась для всех фармацевтических веществ. Он составил от 10 до 250 нг/мл. Для получения калибровочных кривых были приготовлены холостые экстракты матрикса. Калибровочные кривые, полученные для холостых экстрактов матрикса, были получены для концентраций 10, 25, 50, 100 и 250 нг/мл. Нортриптилин (IS) использовался при 100 нг/мл. Калибровочные кривые генерировались путем построения графика зависимости относительной реакции аналитов (пиковая зона аналита/пиковая зона IS) от относительной концентрации аналитов (концентрация аналита/концентрация IS). На рис. 6 приведен пример регрессионного уравнения и коэффициента корреляции ( $R^2$ ) для девяти фармацевтических веществ в цельной крови.

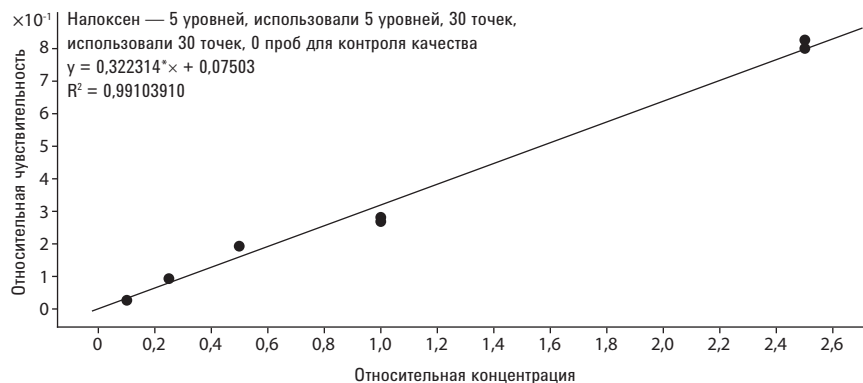


Рис. 6. Пример результатов мини-экстракции, стандартная линейная кривая для налоксона из 10–250 нг/мл,  $R^2 = 0,991$ .

## Извлечение и воспроизводимость

Извлечение и воспроизводимость оценивались путем введения стандартов веществ в образцы цельной крови при концентрациях 25, 50 и 100 нг/мл. Проводился анализ этих контрольных образцов при сравнении с калибровочной кривой для матрикса. На каждом уровне анализ проводился шесть раз. Данные извлечения и воспроизводимости (ОСО) приведены в таблице 4.

Из результатов видно, что для всех фармацевтических веществ было получено приемлемое извлечение (среднее > 90 %) и точность (среднее 7 % ОСО). Наблюдалось незначительное взаимодействие матрикса с исследуемыми фармацевтическими веществами при низких концентрациях < 25 нг/мл.

Таблица 4. Извлечение и ОСО для извлеченных лекарственных соединений

Соединение	25 нг/мл, меченый		50 нг/мл, меченый		100 нг/мл, меченый	
	Выделение	ОСО	Выделение	ОСО	Выделение	ОСО
Лидокаин	81,6	35,3	98,7	15,7	100	11,8
Трамадол	97,2	18,6	105	3,0	104	8,2
Амитриптилин	85	13,6	104	2,1	104	8,2
Бипериден	75,5	14,8	97	4,5	99	8,2
Оксазепам	60,4	17,3	77,0	9,2	78	8,6
Лоразепам	68,4	17,0	81,9	6,8	81,8	8,6
Хлорпромазин	75	14,1	110	10,3	105	6,3
Дилтиазем	63,7	15,8	88,1	2,7	91,7	8,3
Налоксон	68	12,1	80,6	9,0	75,5	7,7



## Заключение

Пробоподготовка с применением мини-экстракции — простой, быстрый и эффективный способ, предъявляющий минимальные требования к навыкам, растворителям и оборудованию. Этот подход, применяемый для экстракции фармацевтических веществ из цельной крови, является альтернативой более сложным способам и прост для внедрения в лабораторную практику. Хотя при низких концентрациях для некоторых фармацевтических веществ наблюдалось взаимодействие с матриксом, методику можно усовершенствовать путем добавления дисперсивной ТФЭ, которая содержит дополнительные материалы для экстракции твердой фазы и служит для удаления матрикса. Колонка Poroshell 120 EC-C18 обеспечивает различную селективность и исключительную форму пика для широкого набора используемых в исследовании фармацевтических веществ.

## Литература

1. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Schenk. *J. AOAC Int.* 86, 4121 (2003).
2. G. Stubbings, T. Bigwood. *Anal. Chim. Acta*, 637, 68 (2009).
3. R. R. Rasmussen, I. M. L. D. Storm, P. H. Rasmussen, J. Smedsgaard, K. F. Nielsen. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 765 (2010).
4. D. Smith, K. Lynam. *GC/μECD Analysis and Confirmation of PCBs in Fish Tissue with Agilent J&W DB-35ms and DB-XLB GC Columns*. Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-6236EN (2010).
5. F. Plössl, M. Giera, F. Bracher. *J. Chrom. A*. 1135, 19 (2006).

## Дополнительные сведения

В настоящем документе приведены типичные результаты. Дополнительную информацию о продуктах и услугах нашей компании см. на веб-сайте [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, описания и технические характеристики в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2013.

Отпечатано в США

3 июля, 2013 г.

5990-8789RU



**Agilent Technologies**