



Аналитические возможности жидкостного хроматографа Маэстро ВЭЖХ с детектором на диодной матрице на примере определения амиодарона в плазме крови человека

Яшин А. Я. к. х. н., ведущий инженер отдела исследований и разработок, ООО Интерлаб, Россия, Москва

Ключевые слова

Жидкостная хроматография, амиодарон, аритмия, плазма крови, детектор на диодной матрице

Резюме

Показаны аналитические возможности Маэстро ВЭЖХ на примере определения амиодарона в плазме крови человека.

Введение

Амиодарон, [2-Бутил-3-бензофуранил]-[4-(2-диэтиламиноэтокси)-3,5-дийодфенил] - кетона гидрохлорид является основным и одним из самых популярных в мире представителей антиаритмических препаратов III класса. Показания препарата – тяжелые аритмии (как правило, при неэффективности или невозможности другой терапии): предсердная и желудочковая экстрасистолия, трепетание и мерцание предсердий, желудочковая тахикардия, фибрилляция желудочков; аритмии на фоне коронарной или сердечной недостаточности и т.п. Биодоступность амиодарона после перорального приёма составляет 30-80%. Максимальная концентрация в плазме крови отмечается через 4-7 часа. Диапазон терапевтической плазменной концентрации - 1-2,5 мг/л (1000 – 2500 нг/мл). Время достижения равновесной концентрации в плазме крови – от одного до нескольких месяцев. Особенности фармакокинетики амиодарона обуславливают необходимость применения высоких нагрузочных доз. Под наблюдением врача необходимо подобрать такую схему (дозу) приема препарата, чтобы достичь нужной терапевтической плазменной концентрации амиодарона при которой это лекарство будет эффективным.

Наиболее популярный способ контроля уровня амиодарона в плазме крови - это ВЭЖХ с УФ детектированием. В этой работе предлагается использовать для этих целей жидкостный хроматограф МаэстроВЭЖХ с детектором на диодной матрице.

Экспериментальная часть

Для анализа использовали чистые вещества фирмы Sigma Aldrich:

Амиодарон гидрохлорид (стандарт, не менее 98%);

Дигидрофосфат калия, ч.д.а.

Вода бидистиллированная;

Ортофосфорная кислота, ч.д.а.

Ацетонитрил для ВЭЖХ

Инструменты:

Жидкостный хроматограф «МаэстроВЭЖХ» с детектором на диодной матрице

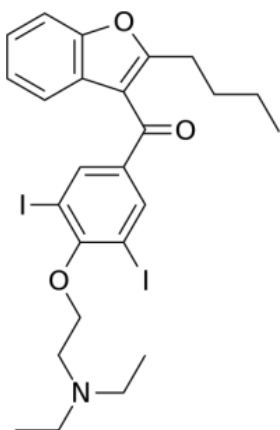
Колонка Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм 150 x 2 мм с предколонкой

Скорость потока 0,5 мл/мин

Длина волны 242 нм

Вводимый объем 20 мкл

Подвижная фаза: А – ацетонитрил, В – 50 мМ КН₂РО₄ (рН=5, НЗРО₄), А:В (45:55)

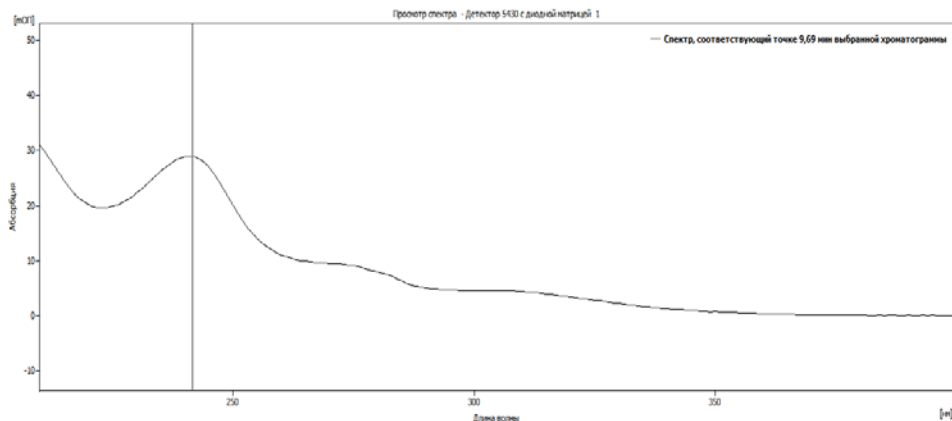


Амиодарон

Результаты и обсуждения

Предварительно были подобраны хроматографические условия разделения амиодарона. Наилучшее разделение амиодарона от других веществ, присутствующих в плазме крови, достигается при использовании элюента: А – ацетонитрил, В – 50 мМ КН₂РО₄ (рН=5, НЗРО₄), А:В (45:55). Время удерживания амиодарона – 9,5 минут.

Затем с использованием детектора на диодной матрице был снят спектр стандарта амиодарона.

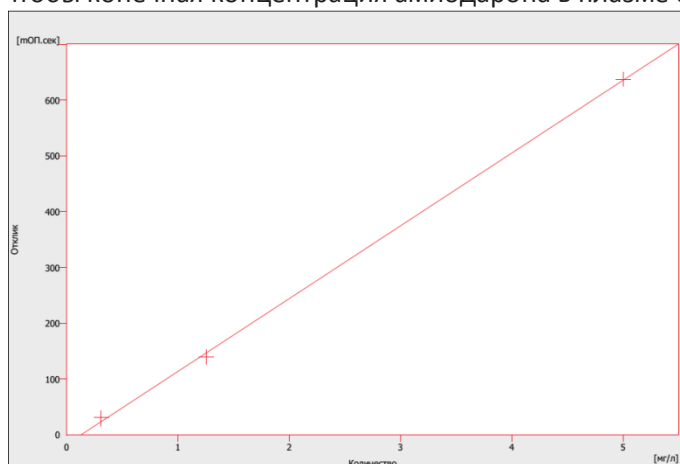


Максимальная чувствительность амиодарона достигается при 242 нм. Этот спектр был занесен в базу данных с помощью ПО Clarity. В дальнейшем идентификация амиодарона в хроматограммах проводилась не только по времени удерживания, но и с учетом этой базы данных спектров.

Количественный анализ проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения «Clarity» для жидкостного хроматографа МаэстроВЭЖХ.

Калибровочную кривую получали в результате анализа проб плазмы с добавками известных количеств стандарта определяемого соединения.

Модельные растворы в плазме крови готовили из рабочих стандартных растворов методом внесения аликвоты последних в плазму крови человека, не принимающего амиодарон, с таким расчётом, чтобы конечная концентрация амиодарона в плазме составляла 312,5; 1250; 5000 нг/мл.



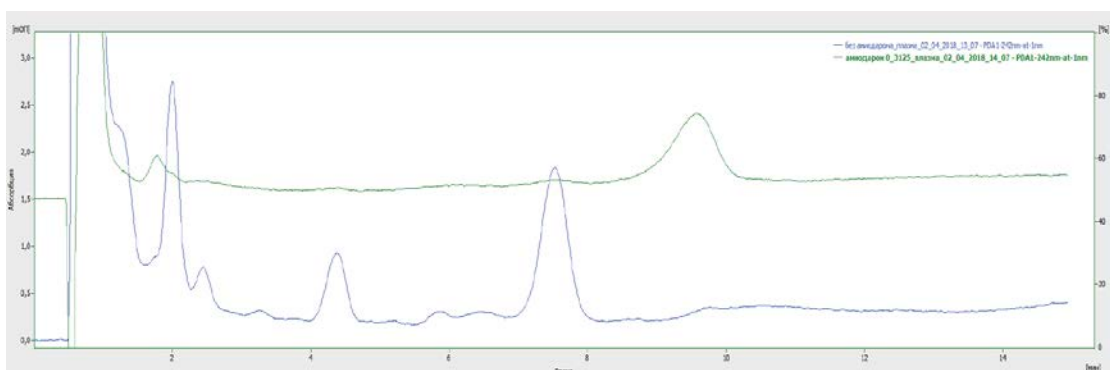
Уравнение градуировочного графика
 $Y = 130,48043 * X - 16,43048$
Коэфф. корреляции 0,9998201

Пробоподготовка:

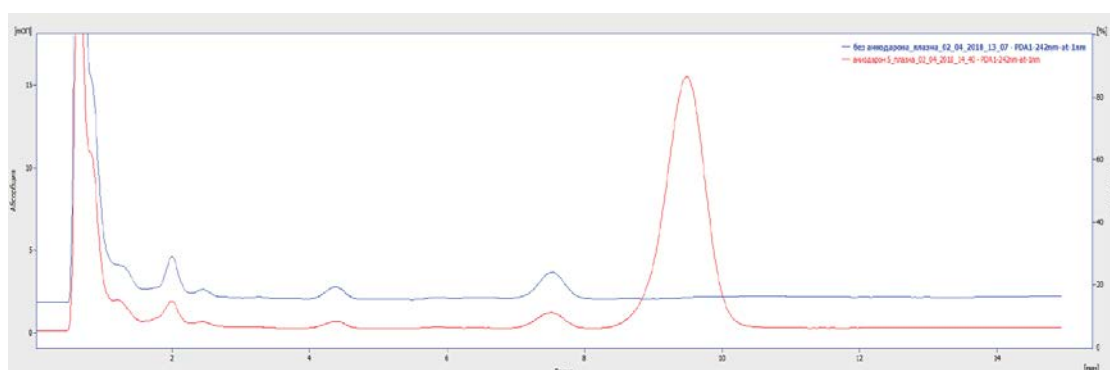
Кровь, взятая у добровольца из локтевой вены в количестве 5 мл, обрабатывалась путём центрифугирования (4000 об/мин в течение 10 минут) для получения плазмы крови. Затем отбиралось 200 мкл плазмы крови в центрифужную пробирку «Эппендорф» и к ней добавлялось 800 мкл ацетонитрила для осаждения белков. Пробирку встряхивали на вортекс-миксере в течение 2 минут, а затем центрифугировали при 20000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант переносится в чистую пробирку и анализировался.

Ниже представлены хроматограммы плазмы крови без амиодарона и с добавками амиодарона.

Наложение хроматограммы плазмы без амиодарона (синяя) и хроматограммы плазмы крови с добавкой 312,5 нг/мл (зеленая):



Наложение хроматограммы плазмы без амиодарона (синяя) и хроматограммы плазмы крови с добавкой 5000 нг/мл (красная):



Ниже приведена итоговая таблица с метрологическими характеристиками методики определения амиодарона в плазме крови. Минимальная определяемая концентрация амиодарона в плазме крови по предлагаемой методике составляет 150 нг/мл.

Метрологические характеристики определения амиодарона в плазме крови

введено, нг/мл	найдено, нг/мл			среднее значение, нг/мл	стандартное отклонение	точность, %	воспроизводимость, %
312,5	354	325	330	336,3	12,66	3,76	7,63
1250	1199	1230	1205	1211,3	13,42	1,11	-3,09
5000	5010	4980	5080	5023,3	41,9	0,83	0,47

Выводы

Жидкостный хроматограф МаэстроВЭЖХ с диодноматричным детектором пригоден для определения амиодарона в плазме крови пациентов.

Прибор можно рекомендовать лабораториям Консультативно-диагностическим, Лечебно-диагностическим, Диагностическим медицинским центрам для мониторинга уровня амиодарона в плазме крови.

За дополнительной информацией обращайтесь в компанию Интерлаб

Московская обл., Красногорский р-н, д. Гаврилково, ЭЖК Эдем, квартал 5, д.12
т. (495) 788-09-83, ф. (495) 755-77-61
www.interlab.ru
e-mail: interlab@interlab.ru

Екатеринбург:
т. (343) 379-57-33,
ф. (343) 379-57-34
e-mail: ural@interlab.ru

Новосибирск:
т. (913)783-12-31
e-mail: zverevav@interlab.ru

Санкт Петербург:
т/ф. (812)643-14-23
e-mail: spb@interlab.ru