

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ВЫПУСКАЕМОЙ ПРОДУКЦИИ. РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ И БАДЫ

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА «МИРАМИСТИН» В ПЛАЗМЕ КРОВИ И МОЛОКЕ КОРОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

Аналитические решения
Markets and Applications Programs



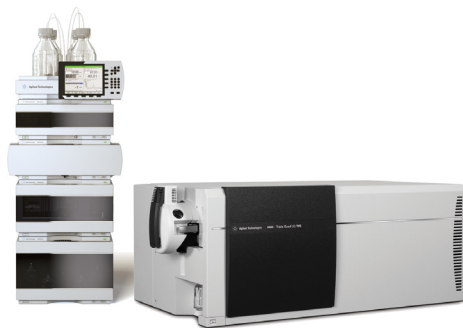
Agilent Technologies

Authorized Partner Laboratory

Авторы

С.В. Осипенко
(Sergey Osipenko),
Т.М. Байгильдиев
(Timur Baygildiev),
И.А. Родин (Igor Rodin),
А.В. Пирогов (Andrey Pirogov)

Московский государственный
университет имени М.В.
Ломоносова, Химический
факультет.



Предложена высокочувствительная и экспрессная методика определения препарата «Мирамистин» в коровьей плазме и молоке методом ВЭЖХ-МС/МС. Методика позволяет определять «Мирамистин» в плазме крови и молоке на уровнях 1.5-100 мкг/л.

Введение

Препарат «Мирамистин» (Бензилдиметил[3- (миристоиламино) пропил]аммонийхлорид, моногидрат) обладает противогрибковым, противомикробным и местным иммуноадьювантным действием. Он нашел широкое применение в различных областях медицины, включая хирургию, стоматологию, травматологию, дерматологию, венерологию и др. В настоящее время исследования возможности расширения сферы применения препарата (например, в ветеринарии) продолжаются, что вызывает потребность в надежных аналитических методиках определения препарата в различных биологических объектах для проведения фармакокинетических исследований. В литературе [1] описан способ определения препарата в гидрогелевых матрицах методом ОФ-ВЭЖХ-УФ, однако он не отличается высокой чувствительностью и селективностью и не подходит для фармакологических исследований препарата. В рамках данной работы разработана и валидирована методика определения препарата «Мирамистин» в коровьей плазме и в молоке, позволяющая проводить различные исследования по использованию препарата в ветеринарии.



Экспериментальная часть

Оборудование

Описание	Номер по каталогу
1290 Infinity Binary Pump	G4220A
1290 Infinity Autosampler	G4226A
1290 Infinity Thermostat	G1330B
1290 Infinity Thermostatted Column Compartment	G1316C
6460 triple quadrupole mass spectrometer	G6460AA

Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Колонка	YMC-PackPro C-18 RS (150 × 2.1 мм, 3 мкм) с предколонкой YMC Pro C18 RS (10 × 2.1 мм, 3 мкм)
Подвижная фаза	A: 10мМ формиата аммония (рН 3.25), B: ацетонитрил
Программа градиента	0-4 мин 25% B; 10-11 мин 90%B; 11-15 мин 25%B
Скорость потока подвижной фазы	0.4 mL/min
Температура колонки	30 °C
Объем вводимой пробы	10 µL
Регистрируемые ионы	m/z 403/268; 403/136
Источник ионов	Agilent Jet Stream ESI в режиме регистрации положительно заряженных ионов
Напряжение на входе в масс-анализатор	132 В
Энергия соударения	17 эВ для MRM-переходов m/z 403/268, 403/136
Температура газа-распылителя	300°C
Температура обдувочного газа	325°C
Скорость потока газа-распылителя	7 л/мин
Скорость потока обдувочного газа	10 л/мин

Реактивы

В работе использовали формиат аммония (>99%, Panreac, Испания). Ацетонитрил, квалификации чистоты «gradient grade» был получен из Biosolve Chemie, Нидерланды. Деионизованная вода получена с помощью Milli-Q Integral system, Миллипор, США.

Пробоподготовка

Для выделения препарата из плазмы и молока использовали метод жидкостной экстракции. 0.5 мл плазмы помещали в полипропиленовую пробирку типа "Eppendorf" объемом 2 мл, добавляли 1.3 мл метанола,

тщательно встряхивали на Multi-vortex V-32 в течение 10 минут, затем центрифугировали при 16000 об/мин в течение 7 минут. Отбирали супернатант, доводили до объема 1.5 мл метанолом. 10 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

Программное обеспечение

- Agilent MassHunter data acquisition for triple quadruple mass spectrometer, Version B.06.00 Build 6.0.6025.0
- Agilent MassHunter Qualitative Software, Version B.06.00

Результаты и их обсуждение

Для извлечения препарата «Мирамистин» из плазмы крови и молока предложен подход, включающий осаждение белков метанолом с последующим центрифугированием. Это позволяет добиться высокой экспрессности анализа за счет минимизации затрат времени на пробоподготовку.

Для оценки степени извлечения мирамистина проводили сравнение площадей пиков, полученных при хроматографировании экстрактов плазмы и молока, при этом в одну серию образцов мирамистин вводили до проведения экстракции, в другую серию – после экстракции, затем рассчитывали степень извлечения. Полученные значения степени извлечения для параллельных измерений 50 мкг/л мирамистина представлены в табл. 1.

№ испытания	Степень извлечения (плазма), %	Степень извлечения (молоко), %
1	95	93
2	92	92
3	92	95
4	91	92
5	90	98
Среднее	92 ± 2	94 ± 2

Таблица 1. Степень извлечения мирамистина из плазмы крови и молока (n=5, P=95%).

Для построения градуировочных зависимостей готовили раствор стандарта мирамистина в смеси ацетонитрил – вода (1:1) с концентрацией 100 мкг/л. Из него методом последовательных разбавлений смесью ацетонитрил - вода (1:1) готовили растворы мирамистина с концентрациями 5000, 2000, 1000, 200, 30 мкг/л. К 0.5 мл плазмы или молока добавляли 25 мкл приготовленных стандартных растворов мирамистина до концентраций 250, 100, 50, 10 и 1.5 мкг/л соответственно. Затем проводили жидкостную экстракцию и по результатам определения мирамистина в полученных экстрактах строили градуировочную зависимость (зависимость площади хроматографического пика мирамистина от концентрации введенного мирамистина) с помощью программного пакета MassHunter. Параметры построенных градуировочных зависимостей представлены в табл. 2.

Образец	Диапазон линейности, мкг/л	R ²
Плазма	1.5-100	0.9993
Молоко	1.5-250	0.9987

Таблица 2. Параметры градуировочной зависимости.

В рамках валидации методики оценены такие пределы количественного обнаружения, предел обнаружения, прецизионность и точность в Intra-day и Inter-day условиях. Метрологические характеристики представлены в табл. 3, а на рис. 1 представлено наложение хроматограмм экстрактов плазмы крови с добавкой 1.5 мкг/л мирамистина и плазмы, не содержащей мирамистин.

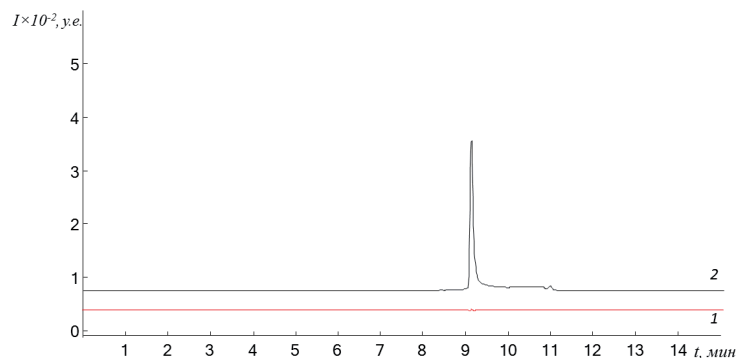


Рисунок 1. Наложение хроматограмм по выбранным реакциям экстрактов плазмы крови, не содержащей мирамистин (1) и экстрактов плазмы крови, содержащей 1.5 мкг/л мирамистина (2).

Предел обнаружения – минимальное количество определяемого компонента, которое можно надежно детектировать данным методом. Рассчитан как концентрация мирамистина, которой соответствует пик с соотношением сигнал/шум 3:1.

Предел количественного определения – минимальное количество определяемого компонента, которое можно надежно количественно определять данным методом с необходимой прецизионностью и точностью. Рассчитан как концентрация мирамистина, которой соответствует пик с соотношением сигнал/шум 5:1.

Прецизионность – относительное стандартное отклонение результатов анализа.

Точность – относительное отклонение результатов анализа от истинного значения.

Inter-day условия – анализ проводится в разных условиях (в разные дни, разными аналитиками).

Intra-day условия – анализ проводится в одинаковых условиях (в один день, одним аналитиком).

	C _н , мкг/л	C _{мин} , мкг/л	Точность (RE), %		Прецизионность (RSD), %	
			Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
Плазма	1.5	0.5	4.91	6.61	5.86	10.15
Молоко	1.5	0.5	3.82	5.76	4.97	8.56

Таблица 3. Метрологические характеристики разработанной методики.

Заключение

Разработана высокочувствительная, селективная и экспрессная методика определения препарата «Мирамистин» в плазме крови и коровьем молоке, позволяющая проводить определение на уровне концентраций от 1.5 мкг/л, в том числе при проведении фармакокинетических исследований.

Список литературы

1. Ю.Г. Чернецкая, Ю.Г. Белковская, Т.В. Трухачева, А.И. Жебентяев, П.Т. Петров “Разработка методики определения мирамистина в гидрогелевых полимерных матрицах с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии”, Вестник фармации, №3, V. 49, **2010**.

Контакты: Agilent MAPs:
maps_agilent@agilent.com

Дополнительная информация:
<http://www.your-analytical-solution.com>

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Published in USA, March 15, 2015
5991-5662RURU

