

Исследование различных уровней гематокрита при анализе сухого пятна крови

Методическая информация

Фармацевтическая промышленность

Авторы:

Уильям Хадсон (William Hudson),
Бен Йонг (Ben Yong), Риту Арора
(Ritu Arora) и Пол Богушевский
(Paul Boguszewski)
Agilent Technologies, Inc.
25200 Commercentre Drive
Lake Forest, CA 92630
США

Введение

Технология сухого пятна крови или сухой матрицы приобрела значительную популярность за последние годы. Фармацевтическая промышленность по достоинству оценила простоту работы с образцами, а также возможность использовать образцы небольших размеров. Однако существенной проблемой, связанной с использованием сухого пятна крови, является влияние гематокрита крови (НСТ) на результаты анализа. Уровень НСТ варьируется в пределах 36–48 у взрослых женщин и 40–52 у взрослых мужчин. Повышенный уровень гематокрита вызывает увеличение вязкости крови, изменяя ее диффузионные характеристики и приводя к различиям в размерах пятен при нанесении на бумагу. Более вязкая кровь хуже диффундирует через целлюлозную бумагу. Однако в последнее время был разработан новый носитель не содержащий целлюлозы. По сравнению с целлюлозой этот материал имеет лучшие диффузионные характеристики с меньшими различиями в размерах пятен. Исследовались различные уровни НСТ (20, 30, 45, 65 и 80).

Экспериментальная часть

Регулировка уровня гематокрита проводилась посредством добавления плазмы или ее удаления из цельной крови. Объем ячейки исходного образца крови измеряли при уровне НСТ 45. Затем образцы разбавляли или концентрировали до уровней 20, 30, 45, 65, 80. В качестве аналитов были выбраны два вещества: пароксетин и нортриптилин. В качестве внутренних стандартов для каждого из аналитов использовались их дейтерированные эквиваленты.



Agilent Technologies

Результаты и обсуждение

Образцы крови объемом 15 мкл с концентрацией 20 нг/мл, содержащие указанные стандарты, нанесли на карту Agilent Bond Elut DMS (кат. № A400150).

Из каждого сухого пятна пробили диск диаметром 3 мм и поместили его в 96-луночный планшет для сбора образцов.

В каждую лунку добавили 300 мкл 0,1% муравьиной кислоты в 80% метаноле (с 0,066 нг/мл смеси дейтерированных внутренних стандартов) и перемешали. Перед помещением в конический флакон для автоматического пробоотборника образцы оставили для экстракции приблизительно на 2 часа.

Затем их выпарили до сухого состояния и растворили в 100 мкл подвижной фазы.

Различия в площади пятна в диапазоне НСТ от 20 до 80 на нецеллюлозной мембране составили приблизительно 11%. Для целлюлозных мембран в том же диапазоне НСТ отклонения в среднем составили 31% (см. Табл. 1).

Выводы

В методах с использованием сухого пятна крови нецеллюлозный материал имеет значительное преимущество над целлюлозным аналогом. Наблюдалось уменьшение различий в площади пятен, благодаря чему уменьшились различия в соответствующих результатах при анализе. В диапазоне НСТ от 20 до 80 размер пятна увеличился всего лишь на 11%, в отличие от растекания пятен на целлюлозе. Различия в размере пятен также можно соотнести с аналитическими данными. Выход при использовании нецеллюлозного материала оставался неизменным в диапазоне НСТ от 20 до 80; значения коэффициента вариации (% CV) отклика образцов составили 10% или меньше во всем диапазоне. Целлюлоза продемонстрировала гораздо большие различия: до 50% для нортриптилина в диапазоне НСТ от 20 до 80. В случае пароксетина наблюдалось снижение отклика, вопреки

Колонка	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 50 мм x 4,6 мм, 2,7 мкм (кат. № 699975-902)	
Подвижная фаза	А: 0,1% водный раствор муравьиной кислоты	Б: Метанол
Режим работы насоса	Расход 400 мкл/мин	
t_0	А: 40%, Б: 60%	
$t_{2-2,1}$	А: 20%, Б: 80%	
$t_{2,01-3}$	А: 40%, Б: 80%	
Время анализа	3:00 мин.	
Температура газа	350 °C	
Расход газа	10 л/мин	
Распыление	20 psi (1,38 бар)	
Полярность	Положительная	

Соединение	Ион Q1	Дочерний ион	Энергия диссоциации (В)
Пароксетин	330,2	192,1	19
Пароксетин-D6	336,2	198,1	19
Нортриптилин	264,2	233,1	11
Нортриптилин-D3	267,2	233,1	11

Таблица 1. Площади пятен на целлюлозном и нецеллюлозном материале при различных НСТ

Нецеллюлозная бумага			Целлюлозная бумага		
НСТ 20	НСТ 45	НСТ 80	НСТ 20	НСТ 45	НСТ 80
0,0369 дюйм ²	0,0378 дюйм ²	0,0409 дюйм ²	0,0750 дюйм ²	0,0653 дюйм ²	0,0550 дюйм ²
CV = -3%		CV = 8%	CV = 15%		CV = -16%

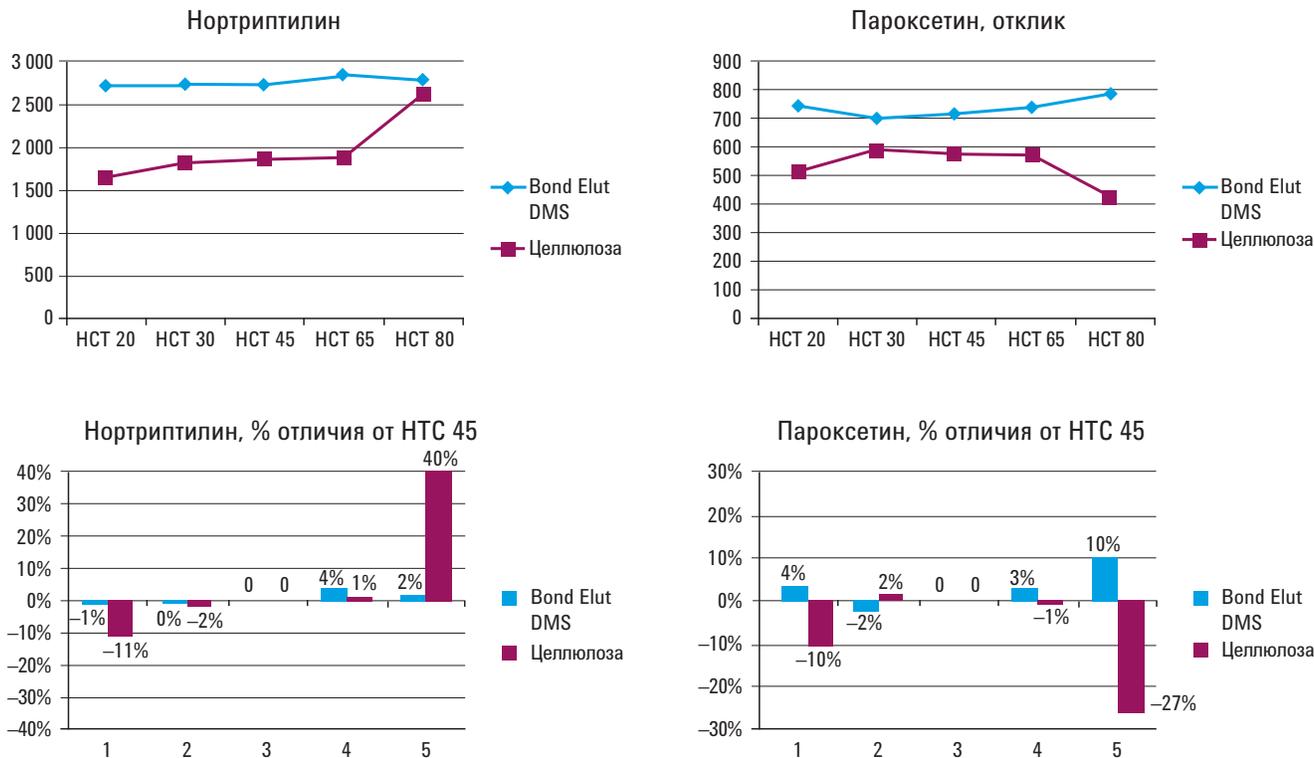


Рис. 1. Сравнение отклика аналитов и зависимость разницы (%) от значений НСТ при использовании целлюлозной и нецеллюлозной бумаги. Отклик аналита при его концентрации в цельной крови 20 нг/мл. Отношение внутренних площадей не использовалось. Нецеллюлозная бумага демонстрирует лучший и более достоверный, по сравнению с целлюлозной бумагой, отклик как для нортриптилина, так и для пароксетина.

меньшему размеру пятна. Возможной причиной различий при использовании целлюлозной бумаги является то, что на бумаге могла осуществляться хроматография, изменившая скорость диффузии аналита по сравнению со скоростью диффузии крови. Было установлено, что влияние гематокрита на отклик соединения при анализе сухого пятна крови меняется в зависимости от используемого субстрата, играющего важную роль в валидации метода. Карта Agilent Bond Elut DMS из нецеллюлозного материала устраняет влияние различий в образцах, упрощая валидацию метода и анализ в целом.

Карты Agilent Bond Elut DMS подходят исключительно для биоанализов Фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных препаратов (ДМРК) и исследований на Всасывание, Распределение, Метаболизм, Выделение (ADME). Их не следует использовать в клинических диагностических процедурах.

Дополнительные сведения

Подробнее о продуктах и услугах нашей компании:
www.agilent.com/chem.

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., 2011.

Напечатано в США

13 июня 2011 г.

5990-8306RU



Agilent Technologies