

УДК 543.3, 542.61, 611.185.1

В. Дорошук, канд. хім. наук,
О. Макуха, асп., Makukha_O@ukr.net,
Є. Мандзюк, інж.,
І. Маценко, студ.,
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МІЦЕЛЯРНО-ЕКСТРАКЦІЙНЕ КОНЦЕНТРУВАННЯ АМЛОДИПІНУ З БІОЛОГІЧНИХ РІДИН ДЛЯ ВЕРХ-МС/МС ВИЗНАЧЕННЯ

Запропоновано методику ВЕРХ-МС/МС визначення амлодипіну у біологічних рідинах з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням фазами неіонної ПАР Triton X-100 при температурі помутніння. Межа виявлення (3 σ -критерій) препарату у запропонованих умовах становить 0,02 нг/мл, межа кількісного визначення (10 σ -критерій) – 0,08 нг/мл. Методика була валідована при визначенні амлодипіну у модельних зразках сечі та за основними хіміко-аналітичними і метрологічними характеристиками переважає методики-аналоги з використанням для концентрування екстракції органічними розчинниками.

Ключові слова: міцелярна екстракція, неіонні ПАР, амлодипін, мас-спектрометрія.

Вступ. Амлодипін відноситься до групи дигідропіридинової антагоністів кальцію, що інгібують надходження кальцію через "повільні" канали у серцевих і судинних гладких м'язових клітинах і використовується у медичній практиці для лікування гіпертонії та ішемічної хвороби серця [1]. Після перорального введення амлодипіну, його біодоступність становить 60–65 %, концентрації у плазмі поступово досягають максимуму протягом 6–8 годин. Так, при щоденному одноразовому прийомі 10 мг амлодипіну здоровими добровольцями, рівноважна концентрація у плазмі крові (C_{max}) складає $18,1 \pm 7,1$ мкг/л. Амлодипін метаболізується в печінці і близько 90 % препарату виводиться з організму у вигляді декількох неактивних метаболітів і лише 10 % у незміненому вигляді [2, 3].

Необхідність визначення мікрокількостей амлодипіну у біологічних рідинах обумовлена дослідженнями фармакокінетичних та фармакодинамічних властивостей нових лікарських засобів на його основі, потребами клінічного аналізу, судово-медичної експертизи та спортивної медицини. Через низький вміст незміненого амлодипіну у сечі та препаратах крові, його визначення, в переважній більшості випадків, проводять із застосуванням попереднього концентрування. Як правило, для цього використовують рідин-рідинну екстракцію органічними розчинниками або твердофазну екстракцію на різних сорбентах [4–6]. Загалом, використання таких методів концентрування вирішує проблему чутливості визначення, однак обумовлює суттєве підвищення трудоемкості та вартості аналізу, зниження експресності та екобезпечності, погіршення метрологічних характеристик гібридних аналітичних методик [4–6]. З літератури відомо, що міцелярна екстракція фазами неіонних поверхнево-активних речовин (НПАР) зарекомендувала себе високоефективним методом концентрування та розділення мікрокомпонентів, характеризується досягненням високих коефіцієнтів абсолютного концентрування при використанні невеликих об'ємів проб, легко сполучається з основними фізико-хімічними методами визначення, що в повній мірі задовольняє вимоги для розробки гібридних аналітичних методик [7–10]. Тому у роботі була досліджена можливість використання міцелярно-екстракційного концентрування амлодипіну для подальшого визначення препарату у біологічних рідинах методом високоефективної рідинної хроматографії з тандемним мас-спектрометричним детектуванням (ВЕРХ-МС/МС).

Експериментальна частина. Міцелярну екстракцію проводили із використанням неіонної ПАР Triton X-100 ("Merck") – 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенілполіетиленгліколь (4-(C₈H₁₇)C₆H₄(OCH₂CH₂)₁₀OH). Вибір Triton X-100 був обумовлений його прийнятною розчинністю у воді, низьким значенням критичної концентрації міцелотворення, великою сольобілізаційною ємністю, здатністю до швидкого формування фаз при нагріванні розчинів, високою в'язкістю та компактністю

утворюваної міцелярної фази, що дозволяло відокремлювати її від водного розчину декантацією. Робочі розчини Triton X-100 готували розчиненням точної наважки препарату у дистильованій воді. У роботі використовували субстанцію амлодипіну з вмістом основної речовини 99,9 %. Розчини амлодипіну готували розчиненням точної наважки препарату в міцелярному розчині НПАР. У роботі використовували неорганічні солі та сечовину кваліфікації "ч.д.а.". Кислотність розчинів контролювали за допомогою рН-метра "pH-340" та іоніміру лабораторного "И-160М" з скляним електродом ЭСЛ-43-07.

Методика експерименту. Розчини Triton X-100, що містили всі необхідні компоненти, поміщали в калібровані мірні циліндри об'ємом 10 мл, закріплювали в штативі й занурювали у водяну баню. Температуру розчинів контролювали за допомогою термометрів, занурених у циліндри та безпосередньо у водяну баню. Нагрівання розчинів проводили зі швидкістю $\sim 1^\circ\text{C}/\text{хв}$. Температуру помутніння фіксували при появі характерної опалесценції розчинів. Для виділення міцелярної фази розчини центрифугували і утворювана фаза НПАР збиралась на дні циліндра. Специфіка препаратів серії Triton полягає у дуже повільному розчиненні міцелярної фази, що утворилася при температурі помутніння, і поверненні системи до рівноважного гомогенного псевдооднофазного стану. Завдяки цьому, після фазового розподілу й охолодження розчинів до кімнатної температури, водну фазу відокремлювали декантацією. Розподіл амлодипіну між водою та міцелярною фазою контролювали методом ВЕРХ-МС/МС після розведення міцелярної фази фіксованим об'ємом ацетонітрилу.

Умови хроматографування. У роботі використовували рідинний хроматограф Ultimate 3000 (Dionex) з тандемним мас-спектрометричним детектором 3200 Q TRAP (Applied Biosystems). Хроматографічна колонка (4,6×150 мм) була наповнена оберненофазовим сорбентом Purospher STAR RP-18e з розміром частинок 5 мкм. Рухома фаза – 0,25 %-ний розчин оцтової кислоти (А) та ацетонітрил (В). Хроматографування проводили у наступному градієнтному режимі:

Час, хв.	А, %	В, %
0	90	10
2	90	10
20	0	100
25	0	100
26	90	10
33	90	10

Швидкість потоку елюенту – 1,0 мл/хв. Об'єм проби, що вводилась в інжектор – 10 мкл. Хроматограма стандартного розчину амлодипіну у присутності НПАР наведена на рис. 1.

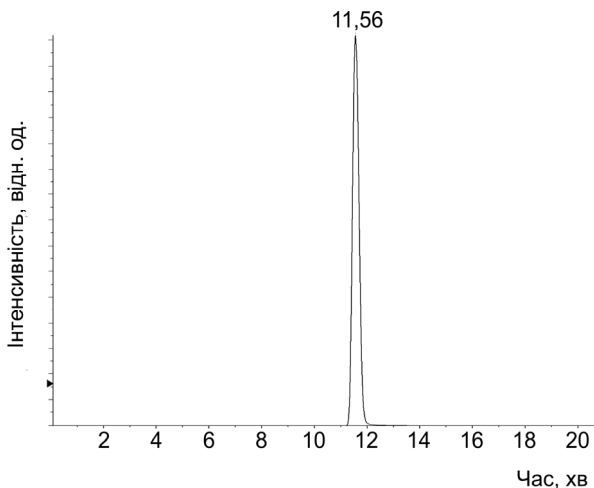


Рис. 1. Хроматограма стандартного розчину амлодипіну в присутності НПАР

Детектування амлодипіну проводили у режимі мультиреактивного моніторингу (MRM) з використанням масзарядних чисел (m/z) $409,4 \rightarrow 238,4$ Da. Іонізація зразка здійснювалась за допомогою електророзпилення. Напруга – 5500 В, температура – 500°C, потенціал фрагментації – 16 В, потенціал входу – 6 В, енергія зіткнення – 21 В. Мас-спектр амлодипіну, отриманий в таких умовах, представлений на рис. 2.

Результати та їх обговорення. Гідрофобність та структура субстрату є визначальними факторами, що обумовлюють ефективність міцелярно-екстракційного вилучення аналіту у фазу НПАР [11]. Загальноприйнятим і універсальним критерієм гідрофобності речовин є їх коефіцієнт розподілу в системі вода – *n*-октанол ($\log P$). Розраховане значення $\log P$ для молекулярної форми амлодипіну становить $3,0 \pm 0,2$, що свідчить про високу гідрофобність препарату і можливість використання міцелярної екстракції для його кількісного вилучення у фазу НПАР. Так, при використанні 2%-ного розчину Triton X-100 при $pH > 8,0$ спостерігається практично повне ($R > 99\%$) міцелярно-екстракційне вилучення амлодипіну (рис. 3). У таких умовах препарат у водно-міцелярному середовищі перебуває у вигляді гідрофобної електронейтральної молекулярної форми, що ефективно екстрагується у міцелярну фазу Triton X-100. Зменшення ступеню вилучення амлодипіну у кислому середовищі пояснюється утворенням гідрофільної протонованої по аміногрупі форми препарату.

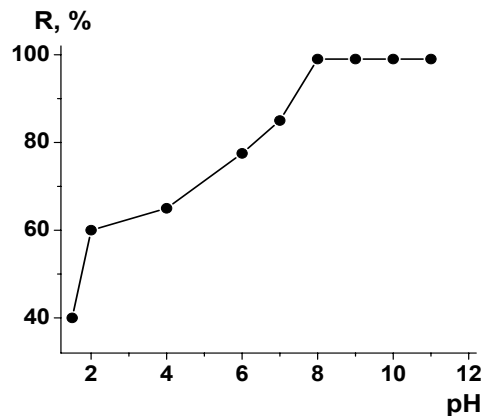


Рис. 3. Залежність ступеня вилучення амлодипіну у міцелярну фазу неіонної ПАР Triton X-100 від кислотності середовища. $C_{\text{НПАР}}=2\%$, $C_{\text{AML}}=0,20$ мг/мл, $V_0=10$ мл

Концентрація неіонної ПАР у розчині впливає на кількісні характеристики вилучення субстрату та одночасно визначає коефіцієнт абсолютного міцелярно-екстракційного концентрування через зміну об'ємів утворених міцелярних фаз. Повне вилучення амлодипіну у фазу Triton X-100 спостерігається при $C_{\text{НПАР}} > 0,4\%$. Зниження екстракції препарату з розведених розчинів Triton X-100 при постійному вмісті амлодипіну (0,04 мг/мл) пояснюється недостатньою солюбілізаційною ємністю таких систем по відношенню до високогідрофобного препарату. Слід зазначити, що максимальне співвідношення об'ємів водної та міцелярної фаз, що визначає граничні можливості міцелярно-екстракційного концентрування, спостерігається саме для розведених розчинів НПАР [12]. Таким чином, вихідна концентрація Triton X-100 в міцелярно-екстракційній системі повинна забезпечувати прийнятний компроміс між розчинністю аналіту і ефективністю процесу концентрування. З урахування такого співвідношення, міцелярну екстракцію амлодипіну проводили з 0,5%-вих розчинів Triton X-100, що забезпечувало 25-кратне концентрування аналіту з 10 мл проби.

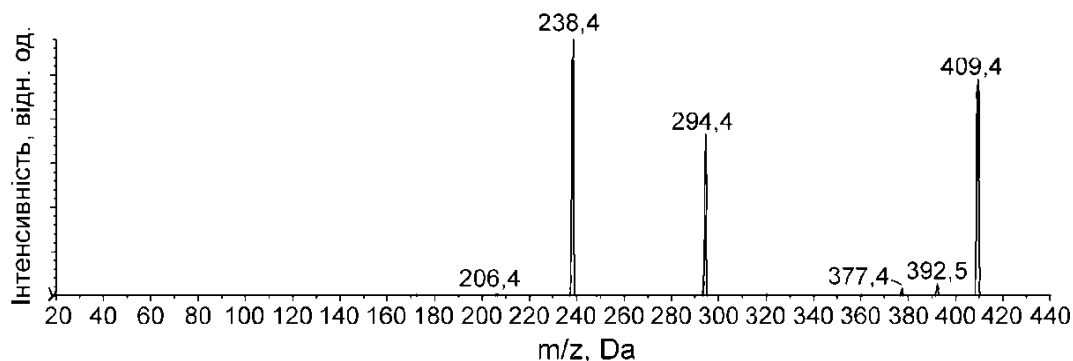


Рис. 2. Мас-спектр амлодипіну (потенціал фрагментації 16 В)

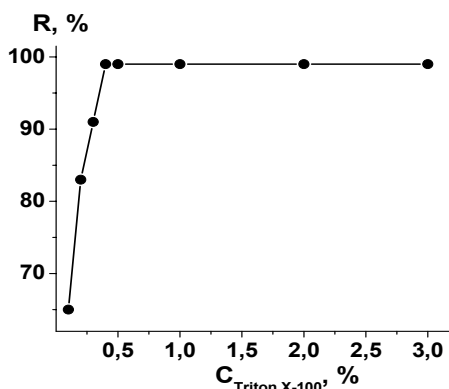


Рис. 4. Залежність ступеню вилучення амлодипіну у міцелярну фазу від концентрації Triton X-100 у вихідному розчині. $C_{\text{AML}} = 0,04 \text{ мг/мл}$, $V_0 = 10 \text{ мл}$, $\text{pH} = 9$

У роботі було також досліджено та оптимізовано вплив рівноважної температури ($T_{\text{вит}}$) фазового розшарування, часу витримування розчинів на водяній бані ($t_{\text{вит}}$), часу центрифугування ($t_{\text{цтр}}$) на вилучення амлодипіну в міцелярну фазу. Встановлено, що кількісне вилучення препарату у фазу Triton X-100 спостерігається при $T_{\text{вит}} = 70^\circ\text{C}$, яка забезпечує повне формування міцелярної фази НПАР. Залежності ступеню вилучення амлодипіну від часів витримування та центрифугування мають вид кривих насичення з виходом на плато повного вилучення при $t_{\text{вит}} = 30 \text{ хв}$ та $t_{\text{цтр}} = 5 \text{ хв}$, відповідно. При цьому, центрифугування розчинів проводили зі швидкістю 4000 об/хв. Знайдені умови виділення міцелярної фази в повній мірі забезпечують дегідратацію поліоксетиленового ланцюга НПАР, швидке зростання кількості та розміру крапель

емульсії НПАР, що сприяє повному виділенню міцелярної фази та кількісному вилученню препарату.

З урахуванням отриманих даних у роботі запропонована методика ВЕРХ-МС/МС визначення амлодипіну в сечі з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням.

Методика визначення амлодипіну. 50 мг неіонної ПАР Triton X-100 розчиняють у 10 мл сечі, додають 150 мкл насиченого розчину NaCl, встановлюють рН утвореного розчину 9,0 за допомогою лугу та витримують на водяній бані при 70°C протягом 30 хв. Після цього, утворену міцелярну фазу 5 хв центрифугують при 4000 об/хв і водну фазу відділяють декантацією. Міцелярну фазу НПАР розбавляють 200 мкл ацетонітрилу та хроматографують (об'єм інжекції 10 мкл). Концентрацію амлодипіну знаходять за градувальним графіком, побудованим в аналогічних умовах.

Розроблена методика пройшла валідаційну перевірку при визначенні амлодипіну у модельних розчинах, що містили основні мікро- та макрокомпоненти сечі: іони натрію – 130–260 ммоль/л, калію – 38–82 ммоль/л, магнію – 4,2–8,4 ммоль/л, кальцію – 2,5–6,2 ммоль/л, хлорид-іони – 100–250 ммоль/л, ортофосфат-іони – 29–45 ммоль/л, сечовину – 333–583 ммоль/л, глюкозу $\leq 0,001$ ммоль/л, низькомолекулярні білки – 25–70 мг/л. Як видно з таблиці 1, лінійність градувального графіка спостерігається в діапазоні концентрацій 0,08–50,00 нг/мл, межа виявлення (3σ -критерій) становить 0,02 нг/мл, межа кількісного визначення (10σ -критерій) – 0,08 нг/мл. Правильність та точність аналізу, перевірені на трьох концентраціях амлодипіну, задовольняють вимогам до біоаналітичних методик визначення фармацевтичних препаратів у біологічних рідинах (табл. 2).

Таблиця 1. Хіміко-аналітичні характеристики запропонованої методики визначення амлодипіну

Рівняння ГГ	$I = (-145 \pm 145) + (17576 \pm 6) \cdot C_{\text{AML}}, \text{ нг/мл}$
Робочий діапазон	0,08–50,00 нг/мл
LOD	0,02 нг/мл
LOQ	0,08 нг/мл

Таблиця 2. Правильність та точність визначення амлодипіну за розробленою методикою

Концентрація амлодипіну, (нг/мл)	Точність, RSD %		Ступінь повернення, %
	Intra-day	Inter-day	
0,09	3,19	4,19	91,3
2,5	1,42	2,17	97,1
50	0,07	0,05	99,9

У роботі також оцінили вплив матричних компонентів на ВЕРХ-МС/МС визначення амлодипіну з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням [13]. Так, розрахований матричний ефект (matrix effect, ME) становить 96 %, що свідчить про низьку міцелярну екстракційну компонентів сечі у фазу НПАР і, відповідно, відсутність їх впливу на параметри визначення. Параметр вилучення (recovery, RE), що характеризує повноту переходу препарату в міцелярну фазу у присутності компонентів матриці, знаходиться на рівні 95 %, що пояснюється відсутністю їх взаємодії з аналітом. Загальна ефективність вилучення (process efficiency, PE) амлодипіну у дослідже-

ній системі ~91 %. Отримані результати показують можливість використання розробленої методики для аналізу реальних об'єктів.

Висновки. Запропоновано методику ВЕРХ-МС/МС визначення амлодипіну у біологічних рідинах з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням фазами неіонної ПАР Triton X-100 при температурі помутніння. Методика була валідована при визначенні амлодипіну у модельних зразках та за чутливістю, основними метрологічними характеристиками, екобезпечністю, вартістю та часом аналізу переважає методики-аналоги з використанням для концентрування екстракції органічними розчинниками.

Список використаних джерел

1. Abernethy D.R. Am. Heart J., 1989, 118, 1110–1103.
2. Williams D.M., Cubeddu L.X. J. Clin. Pharmacol., 1988, 28 (11), 990–994.
3. Meredith P.A., Elliott H.L. Clin. Pharmacokin., 1992, 22 (1), 22–31.
4. Josefsson M., Zackrisson A., Norlander B.J. Chromatogr. B, 1995, 672 (2), 310–313.
5. Tatar S., Atmaca S., J. Chromatogr. B, 2001, 758 (2), 305–310.
6. Heidari H., Razmi H., Jouyban A.J. Sep. Sci., 2014, 37 (12), 1467–1474.
7. Meeravali N.N., Manjusha R., Madhavi K., Jai Kumar S. Desalin. Water Treat., 2016, 57 (55), 26880–26885.
8. Altunay N., Gürkan R. Talanta, 2016, 159, 344–355.
9. Noorashikin M.S., Mohamad S., Abas M.R. Desalin. Water Treat., 2016, 57 (47), 22353–22361.
10. Giebułtovicz J., Kojro G., Piotrowski R., Kułakowski P., Wroczyński P. J. Pharm. Biomed. Anal., 2016, 128, 297–301.
11. Doroschuk V.O., Lelyushok S.O., Rakhilchuk O.O., Kulichenko S.A. J. Colloid Interf. Sci., 2006, 299, 403–409.
12. Doroschuk V.O., Grogul A.B., Mandzyuk Y.S., Makukha O.G., Grytsyk N.O. Chem. Papers, 2016, 70 (10), 1316–1321.
13. Matuszewski B.K., Constanze M.L., Chavez-Eng C.M. Anal. Chem., 2003, 75, 3019–3030.

Надійшла до редколегії 19.01.17

В. Дорошук, канд. хим. наук,
 О. Макуха, асп., Makukha_O@ukr.net;
 Е. Мандзюк, инж.,
 И. Маценко, студ.,
 КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

МИЦЕЛЛЯРНО-ЭКСТРАКЦИОННОЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ АМЛОДИПИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ДЛЯ ВЭЖХ-МС/МС ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Предложено методику ВЭЖХ-МС/МС определения амлодипина в биологических жидкостях с предварительным мицеллярно-экстракционным концентрированием фазами неионного ПАВ Triton X-100 при температуре помутнения. Предел обнаружения (3 σ -критерий) препарата составляет 0,02 нг/мл, предел количественного определения (10 σ -критерий) – 0,08 нг/мл. Методика была валидирована при определении амлодипина в модельных образцах мочи и по основным химико-аналитическим и метрологическим показателям превосходит методики-аналоги с использованием для концентрирования экстракции органическими растворителями.

Ключевые слова: мицеллярная экстракция, неионные ПАВ, амлодипин, масс-спектрометрия.

V. Doroschuk, PhD,
 O. Makukha, PhD-Student, Makukha_O@ukr.net,
 Ye. Mandzyuk, engineer,
 I. Matsenko, Student
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

CLOUD POINT PRECONCENTRATION OF AMLODIPINE FROM BIOLOGICAL LIQUIDS FOR HPLC-MS/MS DETERMINATION

A high performance liquid chromatography method with cloud point preconcentration was developed for determination of amlodipine in synthetic urine. Non-ionic surfactant Triton X-100 as an environmentally friendly solvent was used for the micelle-mediated extraction. The influence of some parameters such as the concentration of Triton X-100, effect of the pH, incubation time, equilibration temperature and centrifugation on effectiveness of cloud point extraction was studied.

The complete extraction of amlodipine into the surfactant-rich phase was achieved by using 2.0 % (w/v) solutions of Triton X-100, the pH > 8.0. Amlodipine, under such conditions, exists in a hydrophobic electroneutral molecular form, that promotes its efficient extraction into the surfactant-rich phase.

During the study, it was found that full extraction ($R \approx 99\%$) of amlodipine in the surfactant-rich phase of Triton X-100 was achieved when initial surfactant concentration was above 0.5 % ($C_{NS} > 0.5\%$ (w/v)).

The suggested method for the HPLC-MS/MS determination of amlodipine in synthetic urine with preliminary cloud point extraction was validated. The calibration curve was linear in the range on 0.08–50.00 ng mL⁻¹. The limits of detection (3 σ) and quantification (10 σ) were 0.02 ng mL⁻¹ and 0.08 ng mL⁻¹ respectively. The matrix effect (96 %), recovery of the extraction procedure (95 %) and overall “process efficiency” (91 %) were also estimated. All validation data is consistent with international acceptance criteria and observed matrix effect is not significant. The suggested method with cloud point preconcentration exceeds the analogous methods, based on extraction using organic solvents, in the sensitivity, metrological characteristics, ecological safety and simplicity.

Keywords: cloud point extraction, non-ionic surfactants, amlodipine, mass-spectrometry.