

利用安捷伦 Bond Elut Plexa 固相萃取柱降低离子抑制以及提高液质灵敏度

应用简报

小分子药物与仿制药

作者

Mike Chang
Agilent Technologies, Inc.
25200 Commercentre Drive
Lake Forest, CA 92630
USA

摘要

与其它的固相萃取产品相比，安捷伦的 Bond Elut Plexa 固相萃取柱能明显地降低离子抑制，从而大大提高灵敏度，降低检测限和定量限。使用该产品对 β 阻断剂进行了提取，得到了极好的线性相关性、回收率和精密度 (RSD%)。

前言

离子抑制效应是液质在生物样品分析中经常遇到的问题，它能导致较差的回收率和精确度，以及增加仪器维护成本和时间。当分析生物样品时，离子抑制无法完全避免，但是应该尽可能地降低离子抑制效应。

安捷伦 Bond Elut Plexa 的吸附剂表面有一层羟基界面，而其它品牌的产品对应的则是酰胺残基。这些酰胺残基将增加固相萃取吸附剂和生物样品中内源性组分的相互反应，会直接导致离子抑制效应。凭借吸附剂表面的羟基基团，Bond Elut Plexa 降低了吸附剂和生物样品中内源性组分的相互反应，从而提高了灵敏度。在本例中，我们证明了采用 Bond Elut Plexa 单分散聚合物固相萃取柱明显降低了离子抑制效应，提高了灵敏度。样品是添加了 β 阻断剂的人血浆。

试验材料和方法

固相萃取试剂和溶液

2% 的氨水	将 20 μ L 稀氨水加入到 1 mL 水中
甲醇	试剂纯或更高
5% 的甲醇溶液	加 50 μ L 甲醇到 1 mL 水中
50:50 甲醇:乙腈	1 mL 甲醇与 1 mL 乙腈混合

固相萃取方法

所有的样品都用同样的固相萃取方法处理

固相萃取产品	Agilent Bond Elut Plexa 96 孔板 (10 mg) (p/n A4969010) W 品牌的 96 孔板 (10 mg) P 品牌的 96 孔板 (10 mg)
样品	100 μ L 人血浆 ¹
预处理	用 300 μ L 2% 的氨水稀释
固相萃取柱活化	1. 500 μ L 甲醇 2. 500 μ L 水
上样	400 μ L 经稀释的血浆样品 (实际血浆样品体积为 100 μ L)
淋洗	500 μ L 5% 的甲醇溶液
洗脱	用 250 μ L 50:50 乙腈:甲醇洗脱两次

实验设定

为了进行离子抑制的比较,用注射泵以每分钟 20 微升的速度将药物化合物溶液(浓度为 50 ng/mL)连续注入液质。对空白血浆样品进行注射进样。空白血浆分别用安捷伦 Bond Elut Plexa 和两个竞争对手品牌的固相萃取柱处理。选择 184 \rightarrow 184 的 MS 离子对来监测脂质化合物。图 1 是实验方法示意图。

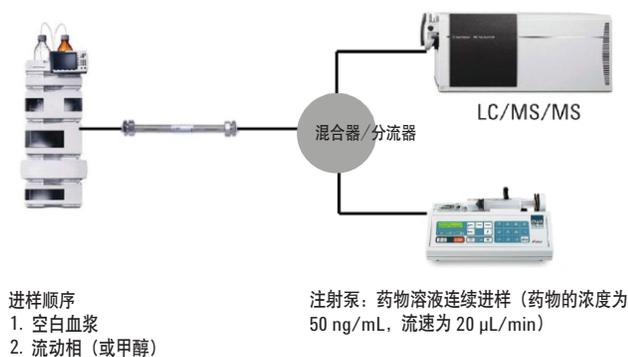


图 1. 离子抑制效应比较分析实验示意图

¹利用血浆样品基质中添加不同浓度的药物化合物建立校正曲线和检测回收率。用经过固相萃取处理的空白血浆进行离子抑制比较分析

液相色谱条件

色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 mm \times 5.0 mm, 2.7 μ m (p/n 699775-902)	
液相色谱仪	Agilent 1260 Infinity LC/MS	
流动相 A	0.1% 甲酸溶液	
流动相 B	0.1% 甲酸的甲醇溶液	
流速	0.4 mL/min	
进样体积	10 μ L	
梯度	时间 (min)	%B
	0	10
	4.0	90
	4.1	10
	6.5	10
温度	样品 (25 $^{\circ}$ C), 色谱柱温度 (室温)	
离子源	喷射流技术 ESI	
干燥气温度	350 $^{\circ}$ C	
干燥气流速	10 L/min	
雾化器压力	35 psi	
鞘流气温度	400 $^{\circ}$ C	
鞘流气流速	12 L/min	
毛细管电压	4000 V	
样品		

阻断剂	pKa	log P	MS/MS		
			离子对	碰撞能量	碎裂电压
醋丁洛尔	9.40	1.71	337.2 \rightarrow 116.1	20	128
纳多洛尔	9.67	0.81	310.2 \rightarrow 254.1	12	92
阿替洛尔	9.60	0.16	267.2 \rightarrow 190.1	12	92
普萘洛尔	9.42	3.48	260.2 \rightarrow 116.2	16	92
吲哚洛尔	9.25	1.75	249.2 \rightarrow 116.1	12	92
美托洛尔(内标)	9.70	1.90	268.2 \rightarrow 116.2	16	92

结果与讨论

如图 2 所示,所有的化合物都得到了很好地分离。如图 3 所示,降低离子抑制将得到更高的灵敏度。图中所示是经过三种固相萃取处理的含纳多洛尔的血浆样品的提取离子流谱图,进样方式是样品溶液用注射泵连续导入,同时对空白血浆进行注射进样。对于大多数的分析,经 Bond Elut Plexa 处理过的样品信号高于用其他两个品牌固相萃取柱处理过的样品。图 4 是用三种固相萃取柱处理过的血浆样品的 184 \rightarrow 184 的提取离子流图叠加图。数据清楚地显示 Bond Elut Plexa 相比其它两种类型的固相萃取柱,能够显著降低离子抑制效应。

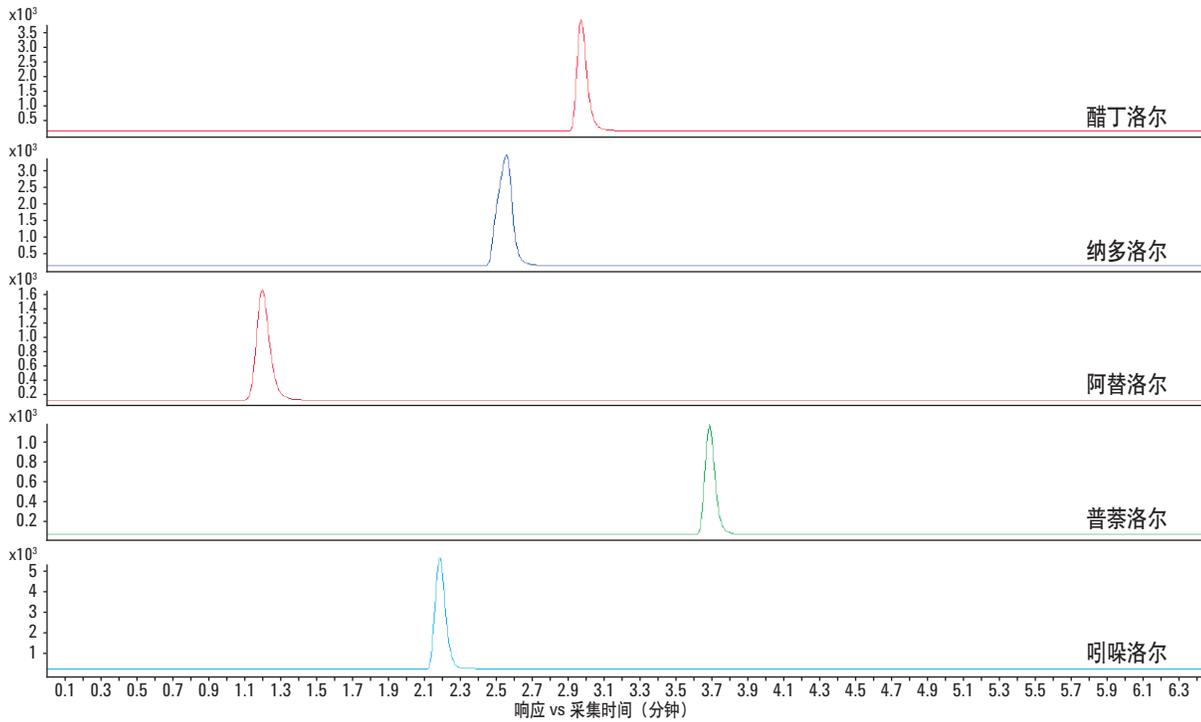


图 2. 采用安捷伦 Bond Elut Plexa 处理的标样添加 (每个标样的浓度均为 5 ng/mL) 血浆样品的质谱图

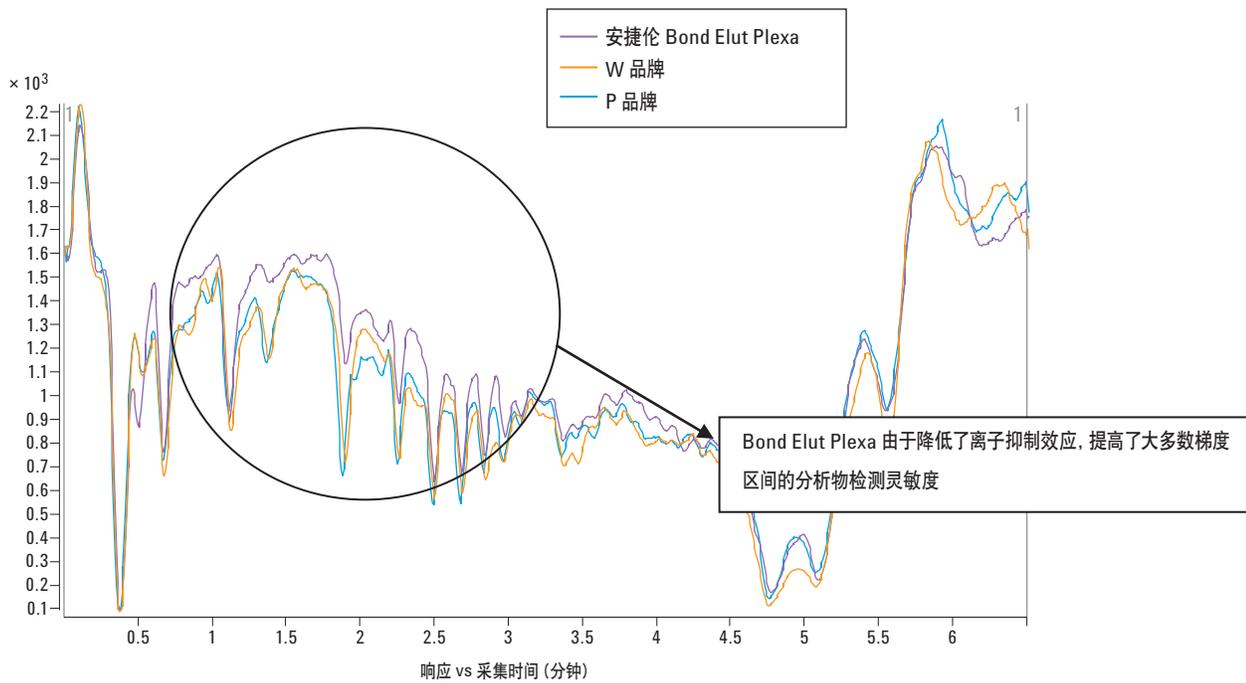


图 3. 在连续导入药物混合样品的同时进空白血浆样品的纳多洛尔的信号叠加图, 显示出安捷伦 Bond Elut Plexa 柱的优越性

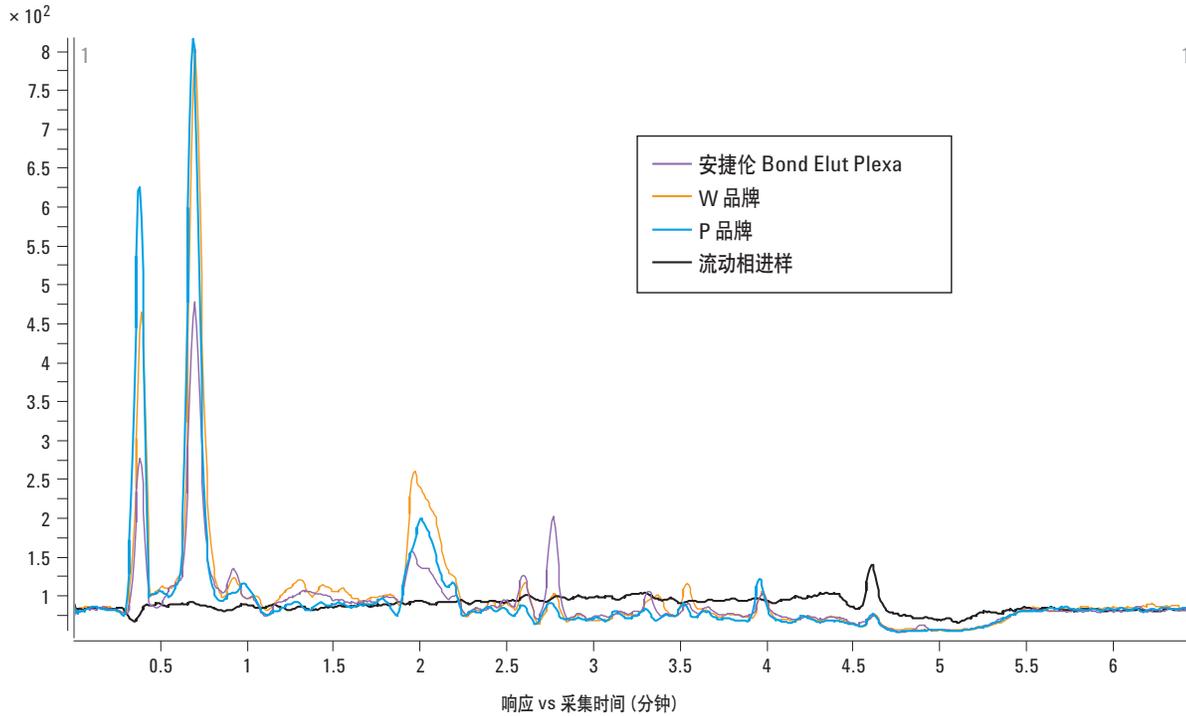


图 4. 用 184 → 184 m/z 监测空白血浆样品中的脂质化合物。安捷伦 Bond Elut Plexa 明显降低了离子抑制效应

利用 Bond Elut Plexa 获得了优异的检测限 ($LOD \leq 0.05 \text{ ng/mL}$) 和定量限 ($LOQ \leq 0.5$)。在三个浓度水平下 (低、中和高浓度, $n = 6$) 进行了回收率实验, 数据总结于表 1 中。结果显示其回收率和精密度 (% RSD) 结果都非常好。还用 9 个浓度水平进行了线性校正曲线的测定 ($0.01 - 100 \text{ ng/mL}$), 所有组分都具有优异的线性度, 其线性相关系数 $R^2 \geq 0.995$ (图 5)。

表 1. 安捷伦 Bond Elut Plexa 上的回收率实验结果

	pKa	log P	检测线 LOD (ng/mL)	定量限 LOQ (ng/mL)	5 ng/mL		50 ng/mL		100 ng/mL		线性相关系数, R^2
					回收率 (%)	精密度 RSD (%)	回收率 (%)	精密度 RSD (%)	回收率 (%)	精密度 RSD (%)	
醋丁洛尔	9.40	1.71	0.01	0.05	79.3	0.5	84.9	0.7	97.0	0.4	0.996
纳多洛尔	9.67	0.81	0.01	0.05	98.5	0.8	94.7	1.4	108.1	0.8	0.997
阿替洛尔	9.60	0.16	0.05	0.5	119.7	2.9	104.0	2.5	109.0	4.5	1.000
普萘洛尔	9.42	3.48	0.05	0.5	106.2	3.7	109.9	7.3	126.9	9.7	0.995
吲哚洛尔	9.25	1.75	0.01	0.05	111.6	1.3	106.0	3.0	115.1	2.8	0.998

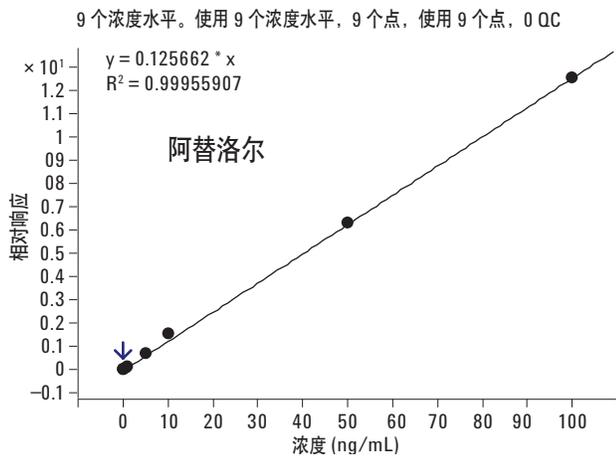
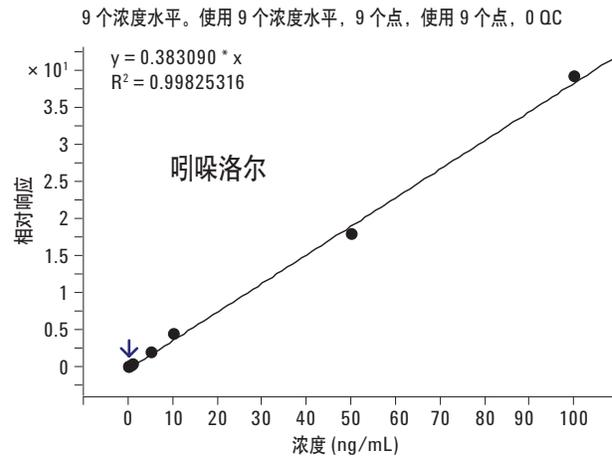
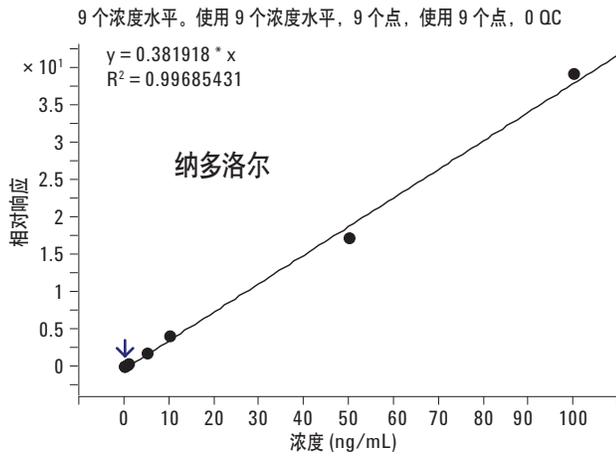
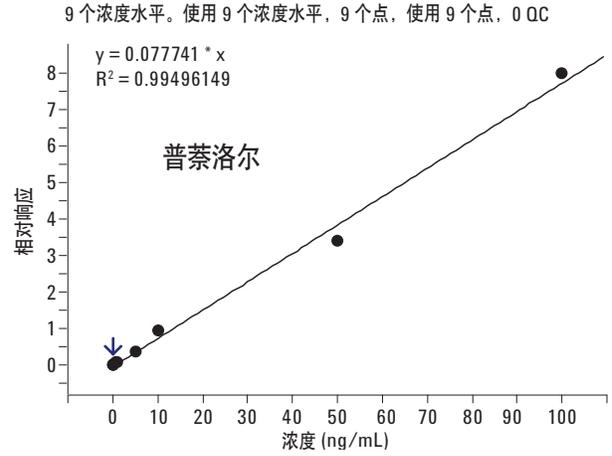
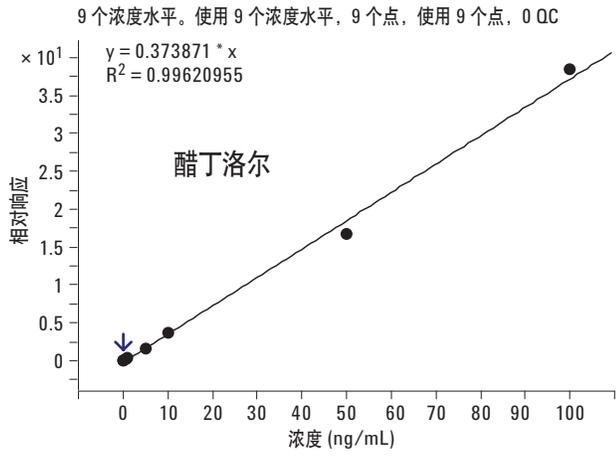


图5. 9个浓度水平下(0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50和100 ng/mL)的5个β阻断剂的校正曲线

结论

与其他品牌的固相萃取产品相比，安捷伦 Bond Elut Plexa 固相萃取柱降低了离子抑制效应，实现了更高的分析灵敏度。灵敏度的改善带来了低检测限 (LOD 0.01 – 0.05 ng/mL) 和定量限 (LOQ 0.05 – 0.5 ng/mL)。此外，还获得了优异的线性度 ($R^2 \geq 0.995$)、回收率以及精密度 (% RSD)。

更多信息

更多关于产品和服务的信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

本文中的信息、描述和性能指标如有更改，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013

2013 年 12 月 1 日，中国印刷

5990-8388CHCN



Agilent Technologies