

采用安捷伦三重四极杆 LC/MS/MS 系统 联合自动化在线样品净化技术快速分析全 血中的环孢素 A、依维莫司、西罗莫司以 及他克莫司

应用简报

作者

Linda Côté, Siji Joseph,
Sreelakshmy Menon 和
Kevin McCann
安捷伦科技公司

摘要

本研究建立了一种高灵敏度、高特异性的分析方法，用于定量分析一组环孢素 A (CsA)、依维莫司 (Eve)、西罗莫司 (Sir) 以及他克莫司 (Tac)。该方法运行时间为 2 分钟，适于同时定量分析全血中的所有四种分析物。



Agilent Technologies

前言

本应用简报介绍了一种采用 Agilent 1260 液相色谱系统结合配置了安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆质谱仪, 灵敏而准确地检测全血中四种免疫抑制药物, 环孢素 A (CsA)、依维莫司 (Eve)、西罗莫司 (Sir) 以及他克莫司 (Tac) 的分析方法。采用串联质谱仪 (MS/MS) 和多反应监测 (MRM) 技术, 该方法中 CsA 的线性范围为 1.95 ng/mL 到 2000 ng/mL, Eve、Sir 和 Tac 的线性范围为 0.10 ng/mL 到 100 ng/mL。

实验部分

试剂和标样

为开发分析方法, 除环孢素 A-d4 和未标记的依维莫司分别购于多伦多研究化学品公司和 Sigma-Aldrich 公司外, 所有未标记和标记的标准品均购于 Cerilliant 公司。所有标准品均保存在 -20 °C 环境下。使用氘代模拟内标物 (ISTD) 以确保准确定量。分析物及其对应的内标物在表 1 中列出。所有其他 LC/MS 级溶剂和试剂均购于 Sigma-Aldrich 和 Honeywell 公司。经认证的健康全血购于当地的一家血库。

此外, 使用了来自 ChromSystems 的校准品和来自 BioRad 的质控品 (QC), 以评估该方法的准确度和精密度 (表 9)。

为测定线性度, 将标准品加入全血中得到高浓度校准标样, CsA 为 2000 ng/mL, Eve、Sir 和 Tac 每种为 100 ng/mL。然后用全血进行两倍连续稀释, 以获取剩余标准曲线浓度。线性分析中用到的分析物浓度在表 2 中列出。

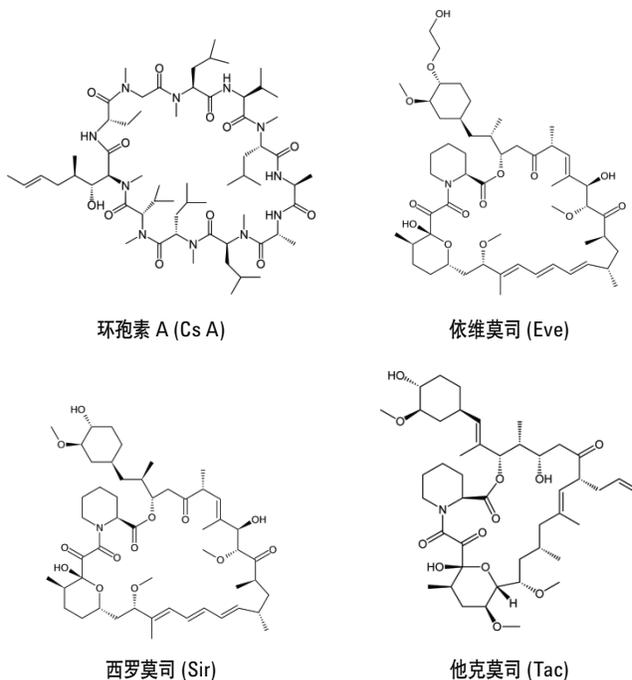


图 1. CsA、Eve、Sir 和 Tac 的结构

表 1. 分析物及其对应内标物列表

分析物	内标物
环孢素 A	环孢素 A-d4
依维莫司	依维莫司-d4
西罗莫司和他克莫司	子囊霉素

表 2. 本研究中所用的线性浓度

校准品	CsA (ng/mL)	Eve, Sir, Tac (ng/mL)
11	2000	100
10	1000	50
9	500	25
8	250	12.50
7	125	6.25
6	62.50	3.13
5	31.25	1.56
4	15.63	0.78
3	7.81	0.39
2	3.91	0.20
1	1.95	0.10

样品前处理

所有校准品、质控品和样品都采用一种简单的蛋白沉淀程序进行前处理：

1. 将 100 μL 的全血与 200 μL 含有内标的沉淀试剂（0.4 M 硫酸锌:甲醇为 1:4）混合
2. 涡旋 30 s
3. 以 10000 rpm 的转速离心 4 分钟
4. 将上清液转移至自动进样器样品瓶中，并使用 LC/MS/MS 分析

液相色谱配置和条件

使用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统进行分析。该系统包括：

- Agilent 1260 Infinity 二元泵 ($\times 2$)
- 带 2 位/6 通色谱柱切换阀的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱
- Agilent 1260 恒温自动进样器

为提高仪器的稳定性，也推荐在自动进样器针座和进样阀之间使用在线过滤器（部件号 5067-1551）。

液相色谱条件在表 3、4、5 和表 6 中列出。

表 3. 液相色谱条件

参数	值
色谱柱	色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 \times 12.5 mm, 5 μm (部件号 821125-936) 分析柱: Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 \times 50 mm, 2.7 μm (部件号 699975-302)
柱温	60 $^{\circ}\text{C}$
进样量	40 μL
针头清洗	1:1:1:1 的甲醇:乙腈:异丙醇:水 + 0.1% FA 清洗 10 s
进样器温度	4 $^{\circ}\text{C}$
运行时间	2 min
缓冲液 A	10 mM 乙酸铵 + 0.2% 甲酸水溶液
缓冲液 B	10 mM 乙酸铵 + 0.2% 甲酸甲醇溶液

表 4. 载样梯度 (泵 1)

时间	流速 (mL/min)	%B
0.00	0.1	50
0.01	2.5	50
1.50	2.5	50
1.80	0.1	50
2.00	0.1	50

表 5. 分析梯度 (泵 2)

时间	流速 (mL/min)	%B
0.00	0.5	95
1.30	0.5	95
1.35	1.0	95
1.55	1.0	95
1.65	0.5	95
2.00	0.5	95

表 6. 阀切换时间

时间	位置
0.00	1
0.50	2
1.65	1

自动化在线样品净化

本方法所用的 HPLC 采用两个二元泵以实现自动化样品净化（图 2）。样品上样到捕集柱，分析物保留在柱内，然后使用第一个泵进行了冲洗。冲洗液流入废液容器，减少了

进入质谱仪的基质量。在分析物即将从捕集柱中洗脱时切换阀门，使洗脱的分析物进入分析柱，然后通过第二个二元泵进行进一步色谱分离。

质谱条件

采用使用了喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆质谱进行分析。独特的 MRM 转换离子对保证了每种分析物定量分析的特异性。内标物 (ISTD) 的使用减少了因样品前处理过程中分析物损失或者因样品基质差异而造成的误差。质谱条件和 MRM 转换离子对在表 7 和表 8 中列出。

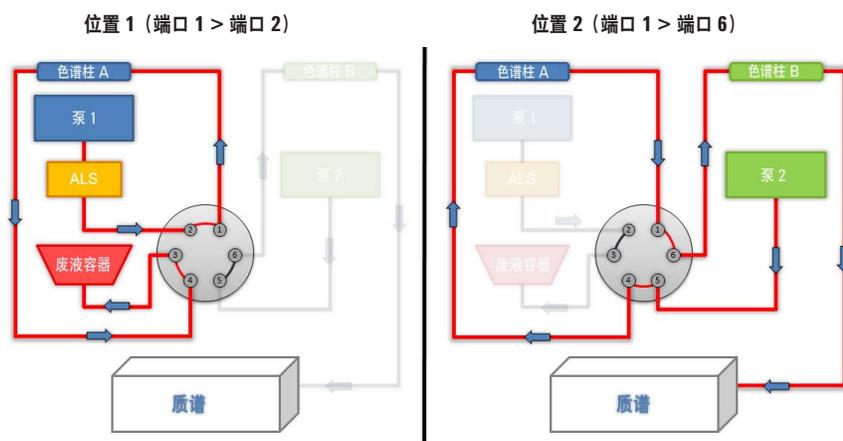


图 2. 使用 2 位/6 通阀和二元泵用于反吹液相色谱配置进行在线样品净化的阀位图示

表 7. 配置安捷伦喷射流源的 Agilent 6460 三重四极杆质谱条件

参数	值
离子模式	正
干燥气温度	225 °C
干燥气体流速	9 L/min
雾化器压力	35 psi
鞘气温度	325 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	4000 V
DEMV	200 V
喷嘴电压	300 V
Q1/Q3 分辨率	0.7 unit

表 8. 监测的 MRM 转换离子对

化合物	母离子	子离子	驻留时间 (毫秒)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)	CAV
环孢素 A-d4	1223.9	1206.8	10	170	12	4
环孢素 A	1219.9	1202.8	10	175	12	4
依维莫司-d4	979.6	912.5	10	170	12	4
依维莫司	975.6	908.5	10	185	12	4
西罗莫司	931.6	864.5	10	170	12	4
他克莫司	821.5	768.4	10	170	16	4
子囊霉素	809.5	756.4	10	175	16	4

数据分析

使用 MassHunter 定量分析软件 (B0.040.01) 进行数据分析。使用 MRM 峰面积与已知浓度的内标物峰面积的比值构建了所有分析物

的校正曲线。校正曲线的线性回归中采用的加权因子为 $1/x$ 。使用质控品进行了日间进样以评估回收率和重现性。图 3 为分析物特征 MRM 提取色谱图。

结果与讨论

所有分析物都观测到了良好的线性，包含测试的所有 11 个浓度水平的线性曲线 R^2 值都大于 0.995 (图 4)。每种分析物保留时间的一致性保证了该方法的重现性。低线性浓度水平下对分析物足够的响应确保了实验中的最低浓度也得到了准确定量。

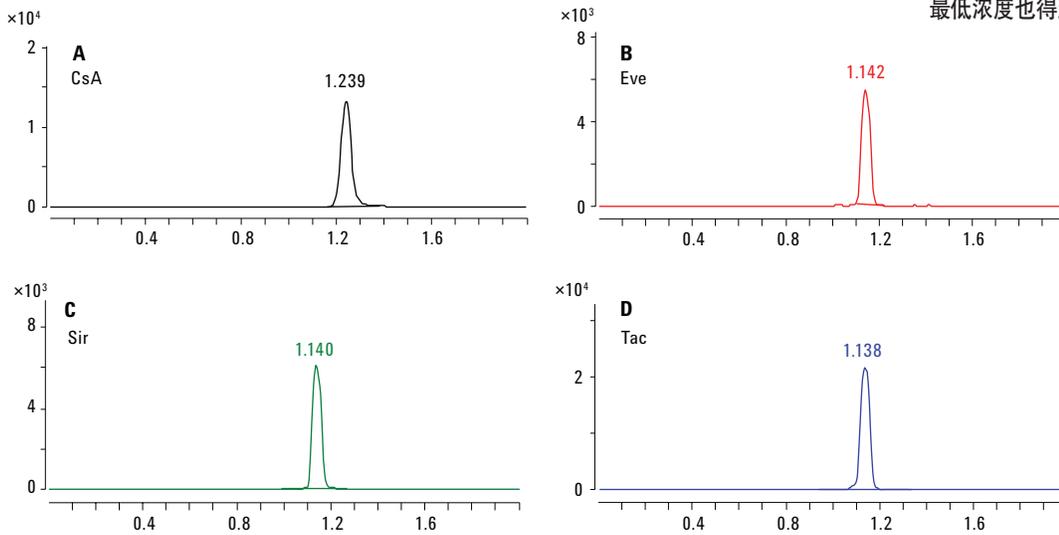


图 3. 环孢素 A (A)、依维莫司 (B)、西罗莫司 (C) 和他克莫司 (D) 定量 MRM 离子对色谱图

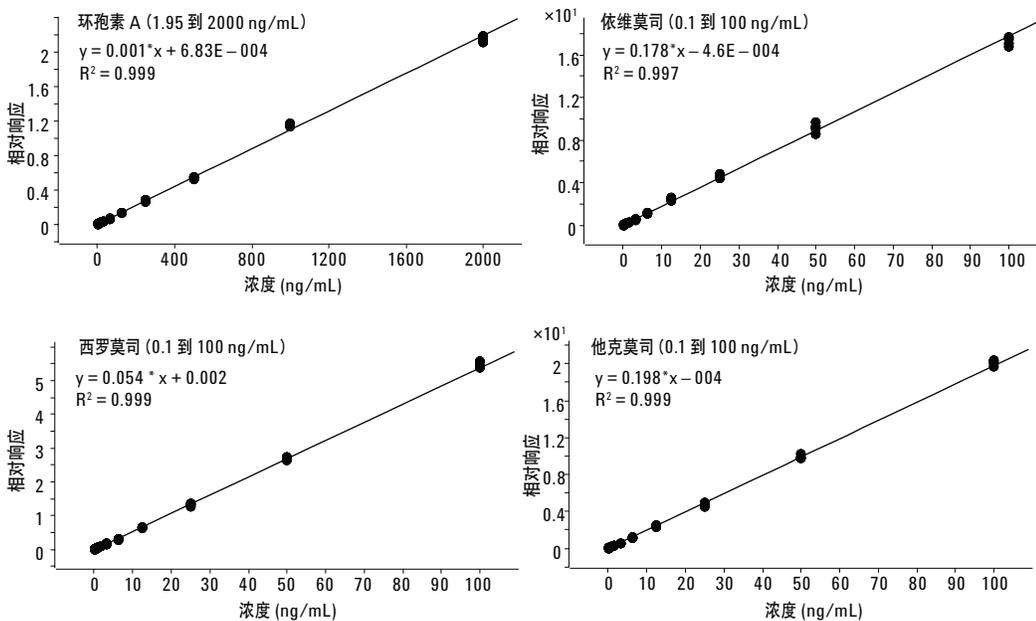


图 4. 环孢素 A (A)、依维莫司 (B)、西罗莫司 (C) 和他克莫司 (D) 11 种浓度，44 个数据点校正曲线 (类型: 线性, 原点: 忽略, 权重: $1/x$)

使用市售校准品 (ChromSystems) 和质控品 (BioRad) 进行了日间进样以评估该方法的准确度和稳定性。数据由 4 名不同的操作人员在 14 天的时间内取得。每个浓度质控品的实测准确度在表 9 中列出。

结论

本研究使用 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS/MS 系统开发了一种高通量、运行时间为 2 分钟的分析方法，用于免疫抑制剂环孢素 A、依维莫司、西罗莫司以及他克莫司的定量分析。经过简单的蛋白沉淀后，进行自动化在线样品净化，最大限度地减少了血液中生物化合物造成的基质效应和离子抑制。采用这种方法实现了全血基质中所有四种分析物可靠且快速的定量分析。所有分析物经证实所需的范围内都具有良好的线性。

表 9. BioRad 质控品结果

化合物	目标 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	准确度 (%)	变异系数 (%)
CsA	95.6	95.6	100.0	6.3
	187.0	197.6	105.7	4.9
	307.0	321.6	104.8	4.8
Sir	5.1	4.8	94.1	13.9
	8.5	8.6	101.2	11.5
	17.3	17.9	103.5	10.4
Tac	4.2	4.5	107.1	7.4
	7.6	7.7	101.3	6.6
	12.5	13.1	104.8	7.9

www.agilent.com/chem/cn

仅用于研究。不可用于诊断程序。

本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司 2013

2013 年 10 月 29 日，中国印刷

5991-3344CHCN



Agilent Technologies