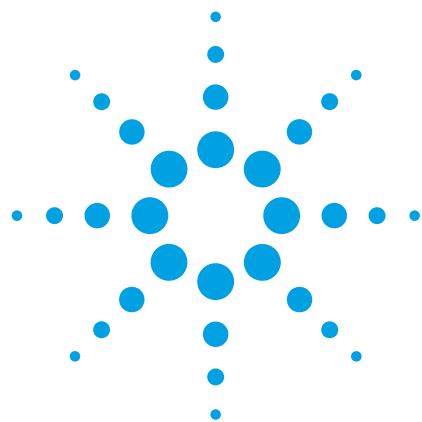




HPLC-Chip/三重串联四极杆质谱用于少量血液样品中的药物定量研究

应用简报

作者

Stephan Buckenmaier
安捷伦科技
瓦尔特布隆
德国

Adrien Bonvie,
Corinne Emotte
诺华制药公司
巴塞尔
瑞士



摘要

实验用啮齿类动物体型和数量的减小，意味着每个药物动力学研究所需的活性药物数量的减少。这将最终使药物代谢动力学实验室的分析成本大大降低。而小动物只能提供很少的血样，尤其是对于为改善药动学数据质量而进行的连续取样研究，每次的样品体积则更少。本应用简报介绍了：

- 利用 HPLC-UHC 芯片和 Agilent 6410 三重串联四极杆系统 (QQQ) 定量 10 μ L 全血中的提取药物
- 提供了一个简单的利用干血斑 (DBS) 的样品萃取流程，该方法对被测化合物表现出良好的回收率和精度
- 证明安捷伦 HPLC-chip/MS 系统卓越的灵敏度和进行极其复杂的生物基质分析时的普遍适用性¹



Agilent Technologies

引言

HPLC-chip 和 Agilent 6410 QQQ 联用可大幅节省 DMPK 实验室的费用¹。基于该系统卓越的检测灵敏度，动物药动学研究中的血样用量可显著减少，这将符合伦理学要求，也有望用于儿科研究。这意味着每个药动学实验均可降低啮齿动物的体型和数量需求，也可降低所需的活性药物量。此外，由于可以对同一个小型啮齿类动物进行连续采样研究，且不会危害其生理健康，不延长恢复时间，因此能够改善药动学数据质量²。

我们最近的一篇文章介绍了特别为这些小分子应用开发的超高容量小分子芯片（UHC 芯片）¹。通过广泛的亲水性（疏水常数 0 至 4.2）药物对芯片集成的富集柱的预浓缩定量功能进行了说明。与配备 API 电离源的 Agilent 6410 QQQ 系统相比，UHC-chip/MS 系统的灵敏度增加了 100 倍，可检测绝对上样量为 10 fg 的血浆中的药物。进一步研究发现，该系统具有极佳的保留时间和峰面积精度、不同芯片之间较好的重复性，以及进样水溶液和血浆样品时较长的芯片寿命。

Barfield 等人最近开发并充分验证了犬血液中对乙酰氨基酚的定量方法³。他们将 15 μ L 血点到 FTA[®] Elute Micro Cards 上，在干血斑上取直径 3 mm 的孔，甲醇提取，离心后定量，采用 HPLC/MS 系统可对低至 0.10 μ g/mL 全血中感兴趣的化合物进行定量。

在上述研究的启发下，我们研究的目标首先是开发使用 UHC-Chip / 6410B QQQ 系统进行 10 μ L 全血样本中被测药物的定量方法。我们旨在采用与参考文献 3 相似的提取方法进行可行性研究。

第二个目标是要确证 Agilent 1200 系列 HPLC-Chip/MS 系统主要的灵敏度优势，即采用该系统能降低血样提取物中药物的检出限^{1,4,5}。本研究的第三个目的是要证明 HPLC-chip 系统对于极其复杂的生物基质样品，如血浆或血液样品分析的普遍适用性¹。

实验部分

试剂

大鼠血从诺华制药公司（瑞士巴塞尔）获得。所有标准品（去甲替林、甲酸（FA），三氟乙酸（TFA））购自 Sigma-Aldrich 公司（德国）。HPLC 级水来自 Burdick & Jackson（美国）。HPLC 级乙腈（ACN）来自默克公司（德国）。

样品制备

用乙腈/水 [50:50 v/v (0.1% FA)] 配制 2 mg/mL 的去甲替林储备液。预浓缩实验中，该储备液由不同比例的乙腈/水 [0:100、

10:90、15:95 和 20:80 v/v (0.1% FA)] 溶液进行稀释。血样标准品：将 10 μ L 去甲替林的乙腈/水 [10:90 的 v/v (0.1% FA)] 标准溶液加标到 90 μ L 大鼠全血中，配制相应的空白对照以及 0.05 ng/mL 到 15.0 ng/mL 范围内五个不同浓度的样品。

样品提取流程的优化

FTA[®] Elute MicroCards (FTA 卡片) 购自 Whatmann（美国）。其纤维基质中包含的化学物质可用于裂解细胞膜、蛋白质变性以及病原体灭活⁶。10 μ L 加标血样点在 FTA 卡片上，用 Harris Uni-CoreTM 打孔器（Sigma-Aldrich，德国）采用图 1 的方法在干血斑内打直径为 1.2mm 的孔。图 1 显示了最佳的提取流程：将包含血斑的小圆片放入 0.5 mL 离心管中，加入 20 μ L 乙腈/水 75:25 v/v 溶液。涡旋混合几秒，在定轨摇床上轻微振荡 30 分钟进行提取。然后在 15000 rpm 转速下离心 15 分钟，用水将该血样提取物稀释 7.5 倍，样品中最终含 10% ACN，以确保在芯片上进行去甲替林的预浓缩及定量。进样前在 4000 rpm 转速下短暂离心。

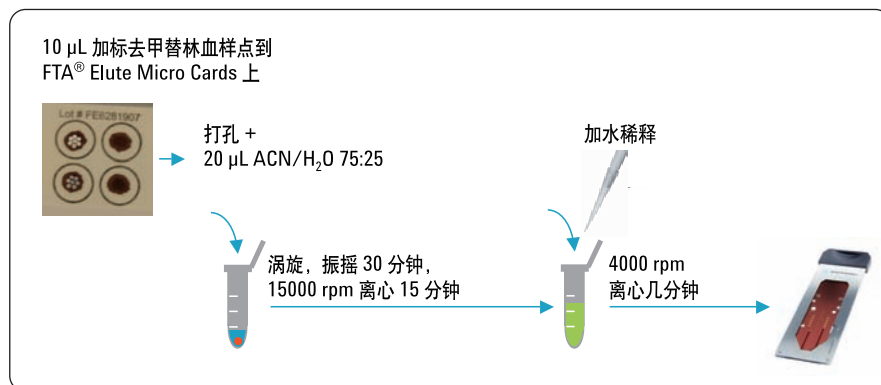


图 1
全血中去甲替林的提取流程。

Agilent 1200 系列 HPLC-chip/Agilent 6410B QQQ MS 系统

Mass Hunter 软件套装包括 LC / MS 数据采集、定性分析和定量数据处理功能。Agilent 1200 系列纳流液相色谱系统包括带温控系统的微孔板自动进样器 (G1377A, G1330B)、微型脱气机 (G1379B)、毛细泵 (G1382A) 和纳流泵 (G2225A)。HPLC-chip、毛细泵、自动进样器、纳流泵和 Agilent QQQ 质谱仪 (G6410B) 之间的所有连接均通过安捷伦 HPLC-chip/MS 接口 (G4240A) 一芯片盒 (chip cube) 实现。*注意：常用于熔融实验的蓝色毛细管 (1000x0.075 mm 直径, G4240-87303) 代替了标准配置中的上样毛细管 (黄色毛细管: 1050x0.025mm 直径, G4240-87301)。为了减少任何潜在的系统污染和/或防止标准品或生物基质样品阻塞富集柱，在自动进样器和 HPLC-chip 接口之间连接了一个在线微过滤器 (1 µm 孔径钛滤芯, Upchurch, M-548)。*

小分子 UHC 芯片 (G4240-63001 SPQ115) 的配置在其它资料中已有说明¹。它具有 500 nL 的富集柱和 150x0.075 mm 直径的分离柱，两个色谱柱均填充 5µm ZORBAX 80A SB-C18 固定相。所有部件，包括纳流电喷雾针 (直径 10 µm) 均被集成到芯片上。建议 UHC-Chip 在反冲模式下运行。

溶剂 A 为 0.1% 甲酸 (FA) 的水溶液，B 为 0.1% 甲酸的乙腈溶液。毛细泵在 2% B 的流动相条件下，以 8 µL/min 的流速上样。表 1 给出了纳流泵梯度 (样品分析) 的优化条件以及样品分析的同时毛细泵的冲洗梯度，这样就可以彻底冲洗上样通路和富集柱。冲洗梯度有助于减少样品残留，并保持血样分析中系统的耐用性。*注意：在冲洗梯度运行时，自动进样器必须切换到旁路！*

进样：采用重叠进样模式进样 5µL，冲洗体积为 8 µL^{7,8}。洗针 20 秒，洗针液为乙腈/水 50:50 V/V (0.1% 的 TFA)。梯度延迟减少 (GDR) 是现在 MassHunter 采集软件的一个新功能。GDR 可弥补分析通路中的延迟体积，并且在芯片接口微切换阀切换到分析模式前启动相应的纳流梯度。结果表明，纳流梯度到达柱头的时间显著提前，缩短了分析时间。GDR 和重叠进样联用，采用表 1 所示的梯度条件，对血样提取物的分析时间少于 13 分钟。

在恒温 300 °C 条件下，干燥气流维持在 4 L/min，为 3 L 氮气和 1 L 过滤干燥空气的混合气体。正离子模式下采集数据。毛细管电压为 -1750 V，帽电压为 -500 V。进样芯片 (G4240-61002) 用于采用 2 ppm 的单一药物优化 MRM 条件。表 2 给出了去甲替林的母离子和子离子，以及优化的碎裂电压和碰撞电压。驻留时间设定为每个色谱峰至少包含 20 个数据点。四极杆在单位分辨率 (0.7 amu FWHM) 条件下运行。ΔEMV = 500V。质谱峰左右两侧被设定为噪音，通过计算峰高和噪音的比值计算信噪比 (S/N)。

纳流泵时间 [min]	%B	流速 (µL/min)	毛细泵时间 [min]	%B	流速 [µL/min]	芯片盒时间 [min]
0	10	0.3	0	2	8	6 = 富集
5.7	60	0.3	3.5	60	20	
6.5	60	0.3	5.7	60	20	
7	10	0.3	5.71	60	10	
			6	60	8	
			6.01	2	8	

表 1
纳流泵、毛细泵和芯片接口盒在 10.5 分钟运行中的最佳条件。
注：6 分钟时芯片接口微切换阀切换回富集的位置，这样富集柱也能被乙腈/水 [60:40 的 V/V (0.1% FA)] 冲洗。

化合物	母离子 [碎裂电压]	碎片 [碰撞电压]		
去甲替林	264.1 [140]	233.1 [10]	117.1 [20]	105.1 [20]

表 2
优化的 MRM 条件。

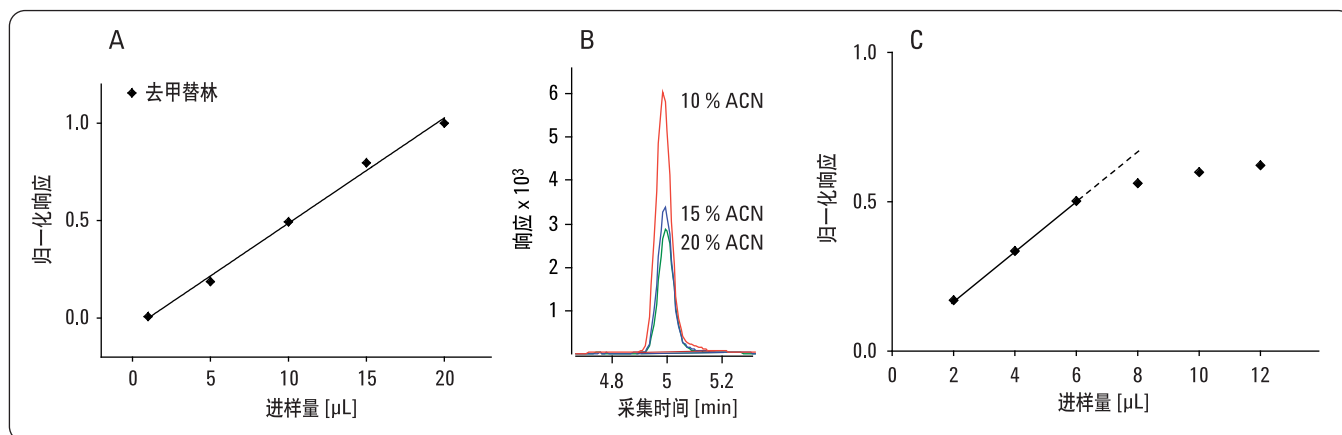


图 2
(A) 浓度曲线：进样量从 1 μL 到 20 μL 变化时，重复进样去甲替林（100 pg/mL ）水溶液时，响应与进样量的关系。归一化响应值等于测得的响应除以最大响应（这里是指 20 μL 进样时的响应）。(B) 进样 4 μL 溶解在 10%、15% 和 20% 乙腈中的去甲替林的 MRM 色谱图 (m/z 233.1 $\rightarrow$ 105.1)。 (C) 与 (A) 相似，不同的是进样的溶液为去甲替林的 10% 乙腈溶液。

结果与讨论

预浓缩去甲替林的定量

为了考察 UHC 芯片预浓缩去甲替林的效果 ($\log P$ 4.74)，配置 100 pg/mL 的标准品水溶液。虽然芯片针对低进样量设计，该实验最大进样了 20 μL 标准品。图 2 (A) 显示了进样量和响应之间成比例的关系，这表明在整个进样量范围均可进行定量富集。

由于血样提取物中含有高百分比的有机相，我们考察了含 10% 到 20% 乙腈的样品溶液中去甲替林的富集表现。图 2 (B) 给出了进样量为 4 μL 时相同浓度的去甲替林的 MRM 色谱图。其中，样品中乙腈含量为 10% 时响应最强，这说明 15% 和 20% 乙腈去甲替林溶液富集时有损失。图 2 (C) 说明 10% 乙腈的去甲替林溶液预浓缩物进样量高至 6 μL 时仍可定量富集。进样到 8 μL 以及更高进样量时形成了一个平台，这说明部分样品流失。因此，选择 5 μL 的进样量进行后续实验。

回收率取决于有机酸比例

为了探讨提取流程中最佳回收率的乙腈比例，打孔得到 10 μL 干血斑的 3 mm 直径小圆片，用 100 μL 含乙腈 10% 至 80% 不等的溶液进行提取。每份提取物等量地取 30 μL 经 SpeedVac 浓缩仪蒸干。随后采用 30 μL 10% 乙腈溶液复溶。70% 和 80% 乙腈溶液提取的结果最好。这一点在图 3 中 10% 和 70% 乙腈提取物的 MRM 色谱图得到了说明。含 70% 乙腈与含 10% 乙腈的提取溶剂相比，峰面积表明前者的回收率是后者的约 5 倍。

数据质量对纳流泵梯度的依赖

表 3 显示了测试去甲替林提取物分离的九个纳流泵梯度。图 4 显示了采用九个梯度得到的叠加 MRM 色谱图。

纳流泵 梯度 %B	时间 #1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	3.2	3.7	4.2	4.7	5.2	5.7	6.2	6.7	7.2
60	4.0	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8
10	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5

表 3
九个纳流梯度具有不同的斜率，流速等于 0.3 $\mu\text{L/min}$ 。

总的趋势是随着梯度洗脱时间的增加，去甲替林的响应（峰面积）也增加。响应最大的为 6 号梯度洗脱条件。

产生这种现象可能的原因是洗脱梯度斜率太大时化合物在流动相中溶解性变差。但这主要适用于反相分离亲水性化合物。因此可以想象，从 10% 至 60% 的乙腈梯度增加过程对去甲替林（logP 4.74）洗脱很可能没有影响。

图 4 中现象的另一个解释为样品中生物基质带来的潜在的离子抑制效应。本实验中采用更长时间的梯度洗脱提高基质中感兴趣化合物的分离，以减少离子抑制效应。相应地，峰面积的精度也会更好，这在不使用内标的分析中更有效。事实上，峰面积精度随着梯度时间的增加而增加。比如，采用 1 号和 6 号梯度重复分析三次，峰面积 RSD 值分别为 12% 和 2%。

因此，选择梯度 6 的条件进行后续实验。

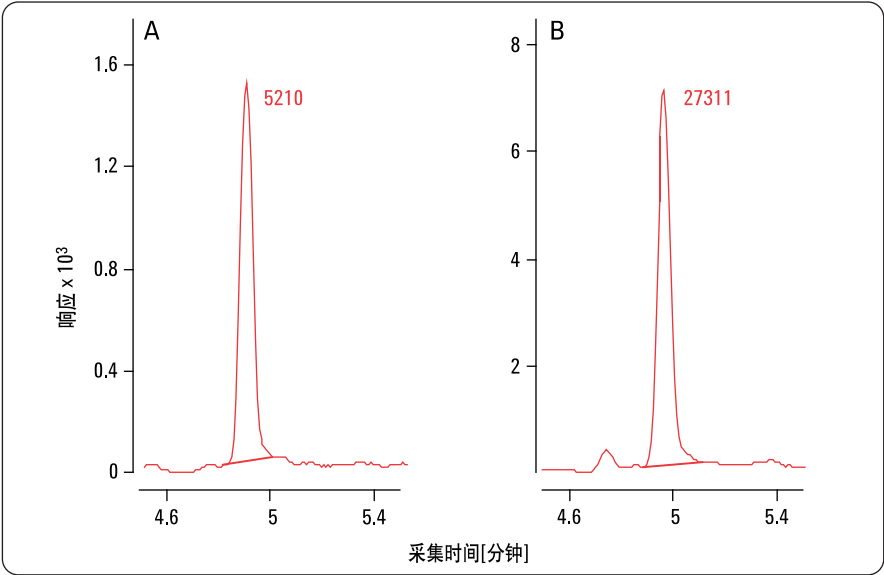


图 3 使用 100 μL 含 10% ACN (A) 和 70% ACN (B) 的提取溶剂从 3 mm 直径的干血斑中得到的去甲替林的代表性 MRM 色谱图 (m/z 233.1 $\rightarrow$ 105.1)。将每份 30 μL 的提取物蒸干，使用相同的 30 μL 10% 乙腈溶液复溶。图中的数字显示的是峰面积。

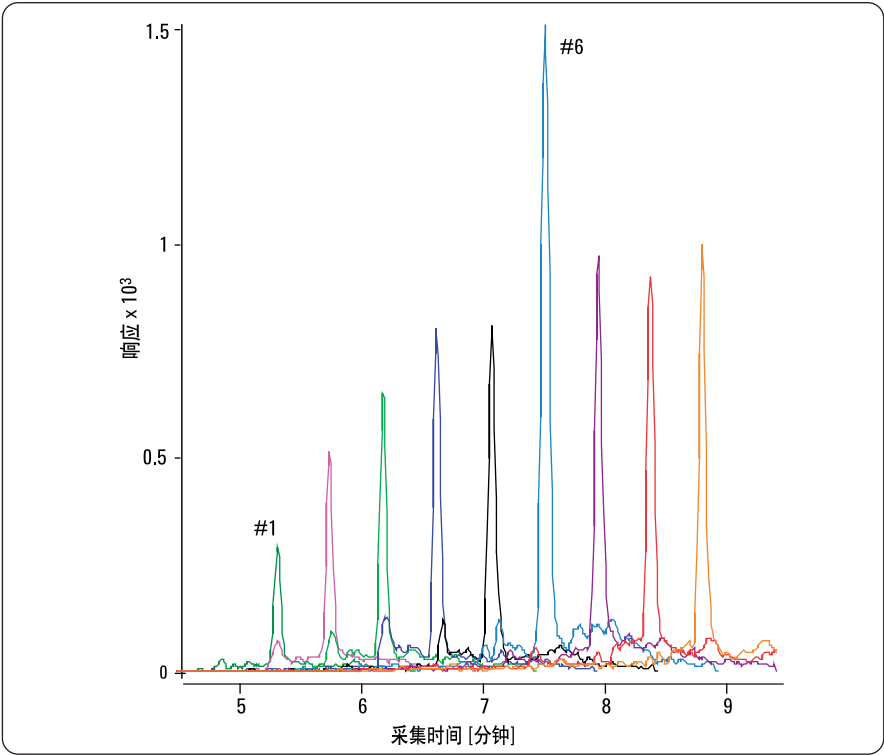


图 4 采用表 3 中不同斜率的线性梯度的 10% 至 60% 乙腈进行去甲替林血液提取物洗脱时得到的叠加 MRM 色谱图 (m/z 233.1 $\rightarrow$ 105.1)。

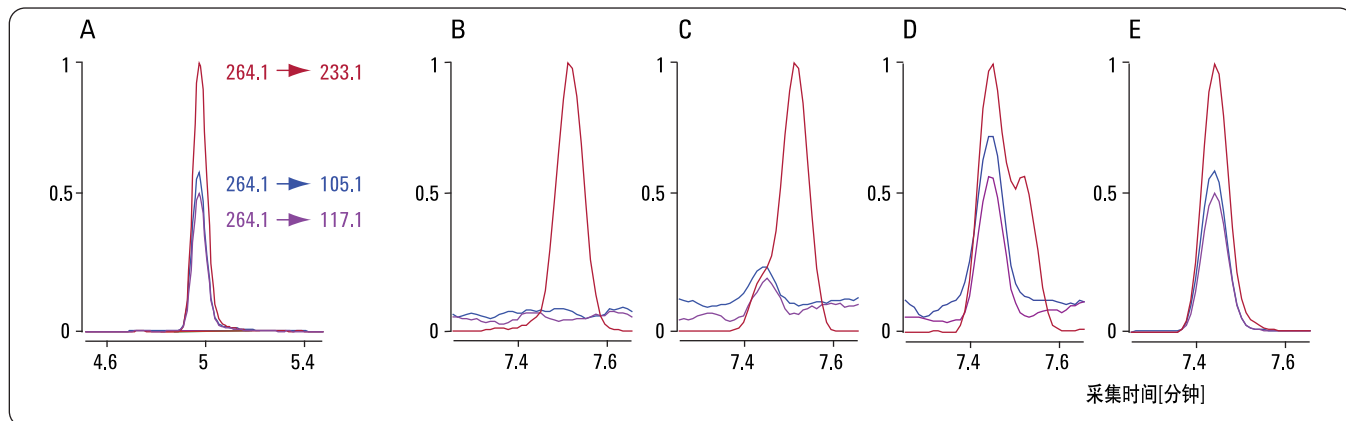


图 5

去甲替林三个转化的 MRM 色谱图 (m/z 264.1 $\rightarrow$ 233.1、105.1 和 117.1)。(A) 去甲替林标准品溶于 10% 乙醇溶液 (此处使用快速梯度); (B-E) 干血斑中提取得不同浓度的去甲替林的结果; (B) 血液空白样品 (C) 0.05 ng/mL (D) 0.5 ng/mL (E) 15 ng/mL。

检测方法的特异性

图 5 (A) 显示了去甲替林标准品溶液 (使用表 3 中的梯度 1 条件) 的 MRM 色谱图。响应最高的信号来自 m/z 264.1 $\rightarrow$ 233.1 的转化, 其次是 m/z 264.1 $\rightarrow$ 105.1, 最后是 m/z 264.1 $\rightarrow$ 117.1。 m/z 233.1 的离子可用作定量离子, 但不能用于血样中去甲替林的定量, 这是由于空白血样提取物在去甲替林的保留时间的位置存在干扰。如图 5 (B) 所示, 空白提取物在其它两个转化不存在干扰。这样, 对于血样提取物, m/z 105.1 可用作去甲替林的特征定量离子。

在浓度范围内去甲替林/基质的干扰关系非常值得关注。图 5 (c) 显示了最低浓度去甲替林标准品的 MRM 色谱图。在 233.1 中, 去甲替林产生一个肩峰, 这在 m/z 105.1 和 117.1 中得到了明显的确认。较高浓度时, 去甲替林为主要响应, 233.1 转化的响应超过了基质的干扰 (图 5 (D))。最后, 随着去甲替林中 m/z 233.1 响应的增加, 基质响应变得非常小直至消失 (图 5 (E))。

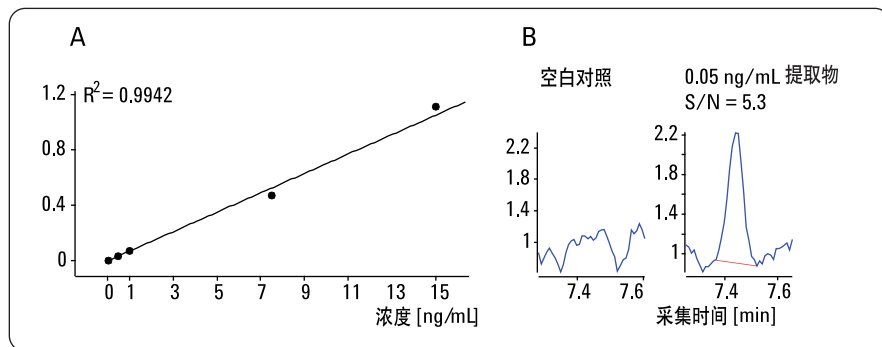


图 6

(A) 全血基质中 0.05 ng/mL 至 15 ng/mL 浓度范围内去甲替林的峰面积与浓度的关系。(B) 空白对照和 LLOQ 中 m/z 264.1 $\rightarrow$ 105.1 定量离子的 MRM 色谱图。

去甲替林的定量、提取流程精密度和回收率

图 6 (A) 显示全血基质中 0.05 ng/mL 至 15 ng/mL 浓度范围内, 采用 1/X 加权线性回归计算的去甲替林的峰面积与浓度呈现良好的线性关系, 相关系数大于 0.9942。图 6 (B) 显示的是最低浓度 (血液中浓度为 0.05 ng/mL, S/N 5.3) 和空白对照中 m/z 264.1 $\rightarrow$ 105.1 转化的 MRM 色谱图。在空白中相应的位置确定没有干扰, 说明该方法特异性好。

在 0.05 ng/mL、0.5 ng/mL 和 7.5 ng/mL 的低、中、高三个浓度水平考察了全血中去甲替林提取流程的日内精密度。每个样品均重复三次进行点样、打孔和提取, 接着平行三次进样进行 chip/QQQ 定量。取三次测定的平均值 (每个浓度), 并计算 RSD 值。对于 0.05 ng/mL 的加标血样, S/N 值通常大于 5, RSD 值为 16%, 这与 FDA 对 LLOQ 的要求一致 (标准品相对于校正曲线的准确度在 80% 到 120% 之间)⁹。0.5 ng/mL 和 7.5 ng/mL 浓度水平的 RSD 值分别为 14% 和 6%。

为了考察回收率，分别进行了空白对照和 7.5 ng/mL 样品的提取。本研究对整个血斑进行了提取，以避免血斑中去甲替林分布不均造成的偏差。没有使用纯水稀释空白血样，而是采用新鲜制备的去甲替林标准品水溶液，这样，就可得到与血斑中一致的预期浓度。包括提取液和提取基质后加标样品（空白加标样品），每个样品进样 3 次测定平均值。采用 Zweigenbaum¹⁰ 等人推荐的方法（加标样品提取后的响应 $\times 100$ / 基质提取后加标样品的回收率）进行回收率测定。计算得到的回收率为 101%。

HPLC-chip 系统的耐用性

本研究采用的 HPLC-chip 系统进样了 500 多个血样提取物。整个分析周期只更换了一次自动进样器连接 6 通阀的毛细管和上样前的在线过滤器。并且 UHC-chip 浓缩柱和分析柱没有明显的压降变化。图 7 (A) 显示了连续三次进样得到的重叠定量离子色谱图。即确定采用的梯度条件后（表 3 中的梯度条件 6）得到的第 350-352 次提取物分析的色谱图。(B) 显示了进样 150 次后芯片的性能。进样大约 150 次后，保留时间没有明显漂移（1.2 秒），并且色谱性能仍然稳定，半峰宽从约 4 秒增加到 5 秒。

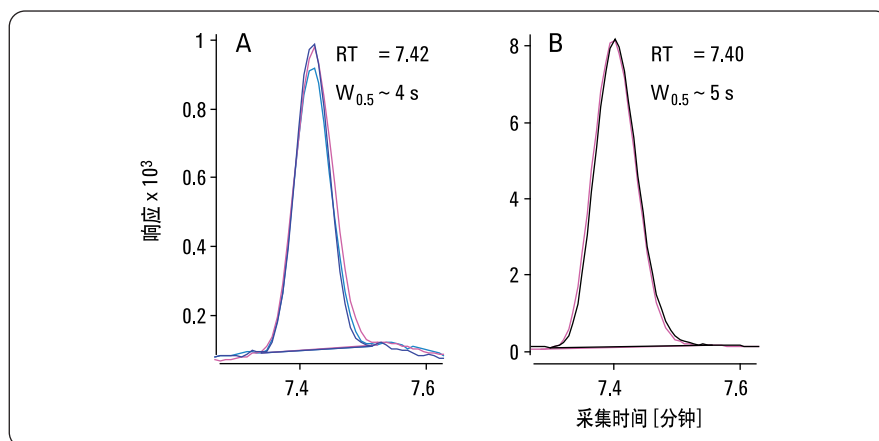


图 7
第 350-352 (A) 和第 511-512 (B) 次血样提取物分析得到的叠加定量离子色谱图。

结论

我们建立了采用 Agilent 1200 系列 HPLC-chip/Agilent 6410B QQQ 系统检测 10 μ L 全血中待测药物去甲替林的特异性定量方法。

优化的提取流程的主要步骤是将血样点在 FTA[®] Elute MicroCards 上，在干血斑上打孔，用 75% 的乙腈溶液提取去甲替林，然后使用 10% 乙腈稀释样品（图 1）。5 μ L 提取物可采用 UHC-chip 进行定量，这是专为这类小分子应用而设计的芯片。¹

采用我们优化的提取流程得到的回收率为 101%。高浓度和最低浓度的日内精密度在 6% 到 16% 之间，这也与美国 FDA 提出的建议相一致⁹。

如图 6 所示，响应与浓度在 0.05 ng/mL 到 15 ng/mL 的范围内呈线性关系，相关性好。峰面积具有出色的精密度，RSD 值小于 2%，说明生物基质的干扰不严重。

该方法的血液中去甲替林提取物的建议 LLOQ 为 0.05 ng/mL。与小体积血样（15 μ L）采用类似的提取方法及（常规）HPLC/MS 检测得到的对乙酰氨基酚（0.1 ng/mL）的 LLOQ 相比³，本方法的检测灵敏度得到了很大提高（比较时必须考虑到质谱对不同的化合物检测灵敏度不同）。

此外，我们发现，即使对于像血液这些极其复杂的生物样品的分析，HPLC-chip 系统也表现出极大的耐用性。分析 500 多个血液提取物样品后，在整个分析期间，系统压降无显著变化，同时保留时间和色谱性能较为稳定（图 7）。

参考文献

1. Buckenmaier S., Vollmer M., Trojer L., Emotte C., "A small molecule chip for the high-sensitivity quantification of pharmaceuticals using triple quadrupole MS" *The Column*, May 2008, 4, 20. **2008.**
2. Diehl K.H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J-M, Van de Vorstenbosch C., "A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes." *J. Appl. Toxicol.*, 21, 15-23, **2001.**
3. Barfield M., Spooner N., Lad R., Parry S., Fowles S., "Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies." *J. Chromatography B*, 870, 32-37, **2008.**
4. Vollmer M., Fandino A., Gauthier G., "Simultaneous assessment of drug metabolic stability and identification of metabolites using HPLC-chip/iontrap mass spectrometry". *Agilent Application Note 5989-5129EN.*
5. Vollmer M., Buckenmaier S. "Using nanospray HPLC-chip/TOF for routine high sensitivity metabolite identification" *Agilent Application Note 5989-5938EN.*
6. Information provided by Whatmann.
7. Yin, H. and Killeen, K. "The fundamental aspects and applications of Agilent HPLC-Chip." *J. Sep. Sci.* 30, 1427-1434, **2007.**
8. Ghitun M., Bonneil E., Cote E., Gauthier G.L., Thibault P., "Advantages of using Intelligent Sample Loading with the HPLC-Chip for automated sample enrichment." *Agilent Application Note, 5989-5222EN, 2006.*
9. Guidance for the industry – Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, *Centre for drug Evaluation and Research*, May **2001.**
10. Zweigenbaum, J., Henion, J., "Bioanalytical High-Throughput Selected Reaction Monitoring LC/MS determination of Selected Estrogen Receptor Modulators in Human Plasma: 200 Samples/DAY." *Analytical Chemistry*, 72, 2446-2454, **2000.**

www.agilent.com/chem/hplc-chip:cn

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2008
2008 年 11 月 1 日 中国印刷
5998-9896CHCN



Agilent Technologies