

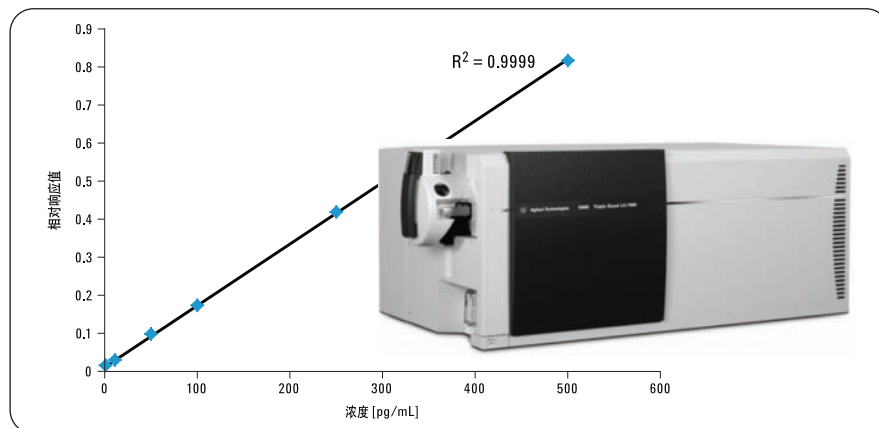
血浆药物定量分析所需的高速、 超高灵敏度和耐用性

应用简报

药物发现和开发：药物代谢及药代动力学（DMPK）

作者

Stephan Buckenmaier
应用科学家
安捷伦科技
Hewlett-Packard-Straße 8
76337 Waldbronn
Germany



摘要

本文介绍了安捷伦 1200 系列高分离度快速液相色谱仪（RRLC）配合安捷伦 6460A 三重四级杆串联（QQQ）质谱仪在人血浆生物分析中的应用。

高通量分析表现在：待测药物和内标物都能够在色谱中于 1 分钟内完全洗脱。

超高灵敏度表现在：线性范围涵盖了人体血浆微量水平药代动力学研究的典型浓度范围（1–500 pg/mL 血浆浓度）。

耐用性和重现性表现在：在上述浓度范围，5 天之内通过该 LC/MS 系统可分析超过 1000 个血浆样品。



Agilent Technologies

引言

使用 LC/MS 定量分析生理样本如血浆和血清中的药物，可以认为是药物发现中药代动力学 (PK) 研究的特征。通过 LC/MS 分析得到的 PK 图线提供了候选药物的生物利用率和半衰期信息，以便比较并选出先导化合物用于进一步研究。制药行业需要灵敏度高、选择性好、耐用性强的分析方法，同时还应具有高通量，以便快速获得这些信息并迅速作出判断。由于由体外实验或动物实验的 PK 数据外推得到的人体剂量数据常常具有误导性，出现了“first-in-human trial” (首次人体试验，即人体微剂量试验) 的概念，因而对生物分析的灵敏度设置了更严格的要求，即人体微剂量水平实验的药物用量必须要低于动物或体外实验模型中预期治疗剂量的 $1/100^{1-8}$ 。

目的

为证实安捷伦 1200 系列高分离度快速液相色谱 (RRLC) 与安捷伦 6460A 三重四级杆串联质谱 (QQQ) 联用系统的高通量、超高灵敏度和耐用性而设计了本实验。人血浆中添加药物的浓度设定在人体微剂量水平研究的典型范围 (1–500 pg/mL 血浆浓度)。在随后的血浆检测中，五个工作日内完成了包含 1000 多个样品的分析序列 (例如每天进样 200 次)。每天的分析序列之后都用血浆中药物的系列标样来评估系统性能。

实验

仪器

- 安捷伦 1200 系列 RRLC 系统，包括 SL 二元泵、微量真空脱气机、SL 柱温箱和 SL 自动进样器。
- 安捷伦 6460A QQQ 质谱仪
- 安捷伦 20 通多用途真空处理站
- 安捷伦 SampliQ 优化聚合物技术 (OPT) 萃取柱 (30 mg)
- 安捷伦 ZORBAX C18 Eclipse Plus 色谱柱 2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm
- 安捷伦 Mass Hunter 工作站软件，用于仪器控制、数据采集及数据处理

LC 方法操作条件

流动相 A	水 [0.1% 甲酸 (FA)]	
流动相 B	乙腈 (ACN) (0.1% FA)	
梯度设置	t (min)	%B
	0	30
	0.1	30
	0.95	60
	1	60
	1.01	90
	1.20	90
	1.21	30
流速	0.8 mL/min	
柱温	40 °C	
停止时间	1.5 min	
梯度平衡时间	2.5 min	
进样体积	8 μL	
洗针	10 s, 乙腈/水 60:40 v/v (0.1% TFA)	

MS 方法操作条件

扫描模式	采用 MRM Masshunter Optimizer 软件获得如表 1 中所示的优化条件。
离子化模式	结合安捷伦喷射流技术的 ESI 正离子模式
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	11 L/min
雾化器压力	20 psi
毛细管电压	2000 V
鞘气温度	400 °C
鞘气流速	12 L/min
喷嘴电压	0 V

化学品

人体血浆以及所有标准化学品 (去甲替林、曲米帕明、甲酸 (FA)、三氟乙酸 (TFA)) 购于 Sigma-Aldrich 公司 (德国)。HPLC 级水购自 Burdick & Jackson 公司 (美国)，HPLC 级乙腈和甲醇购自 Merck 公司 (德国)。

血浆检测

校正标样: 10 μL 去甲替林的参比标样 (溶于乙腈/水 = 70:30, v/v) 添加到 190 μL 人血浆中，用来配制空白溶液和在 1 - 500 pg/mL 范围内的 6 个浓度的标样溶液，添加 400 μL 2% 甲酸和 20 μL 曲米帕明内标溶液，涡旋混匀。

安捷伦 SampliQ OPT 固相萃取柱 (30 mg) 用 1 mL 甲醇和 1 mL 水 (0.1% 甲酸) 活化，加入样品混合物后先后用 1 mL 0.1% 磷酸和 1 mL 5% 乙腈溶液淋洗，然后用

化合物	ISTD	母离子	MS1 分辨率	子离子	MS2 分辨率	驻留时间	碎裂电压 (V)	碰撞电压 (V)	极性
曲米帕明	X	295.2	Unit	100.1	Unit	30	126	12	正
去甲替林		264.2	Unit	233.1	Unit	30	115	10	正
去甲替林		264.2	Unit	117.1	Unit	20	115	18	正
去甲替林		264.2	Unit	105.1	Unit	20	115	18	正

表 1
使用 MassHunter Optimizer 自动优化后的 MRM 参数

200 μ L 乙腈/水 = 70:30 (v/v) 洗脱, 提取物用水稀释 2 倍, 使溶剂组成与流动相初始比例相似。血浆样本按相同步骤进行处理, 4000 rpm 离心 5 分钟后进样。

结果与讨论

基质效应和回收率

通过新型 SampliQ OPT 填料获得的基质效应因子和回收率分别参考 Zweigenbaum 等提出的公式 (1) 和 (2)^{9,10}。去甲替林标样配制两个浓度: 500 和 100 μ g/mL, 添加后的血浆和空白样本, 按前述血浆检测方法进行提取。空白提取液经缓速氮气吹干后用参比标样重新溶解。通过这种方法, 就可在已提取添加溶液、提取后空白添加溶液和参考标样中获得相同的去甲替林浓度。将样品以 1 μ L 体积重复进样两次, 取平均值进行计算。去甲替林浓度为 500 和 100 μ g/mL 时回收率分别为 97% 和 95%。基质效应因子为 0.8。内标物曲米帕明的结果与之相近。

高通量 LC/MS 方法

图 1 是 SPE 提取物的典型 MRM 谱图。在提取前血浆中去甲替林的浓度为 500 μ g/mL。去甲替林和内标物在 1 分钟内可以完全洗脱下来, 证明该 LC/MS 分析的高通量特性, 使用色谱柱交替再生技术还可以获得更高的通量。使用 RRLC/QQQ 系统, 在进行此类 PK 分析时, 分析周期时间(包括进样、样本分析、柱再生)可以低于 1.5 分钟¹¹。

$$\text{公式 (1): 基质效应因子} = \frac{\text{空白提取后添加标样溶液的响应值}}{\text{参比标样的响应值}}$$

$$\text{公式 (2): 回收率} = \frac{100 \times \text{添加标样后提取溶液的响应值}}{\text{空白提取后添加标样溶液的响应值}}$$

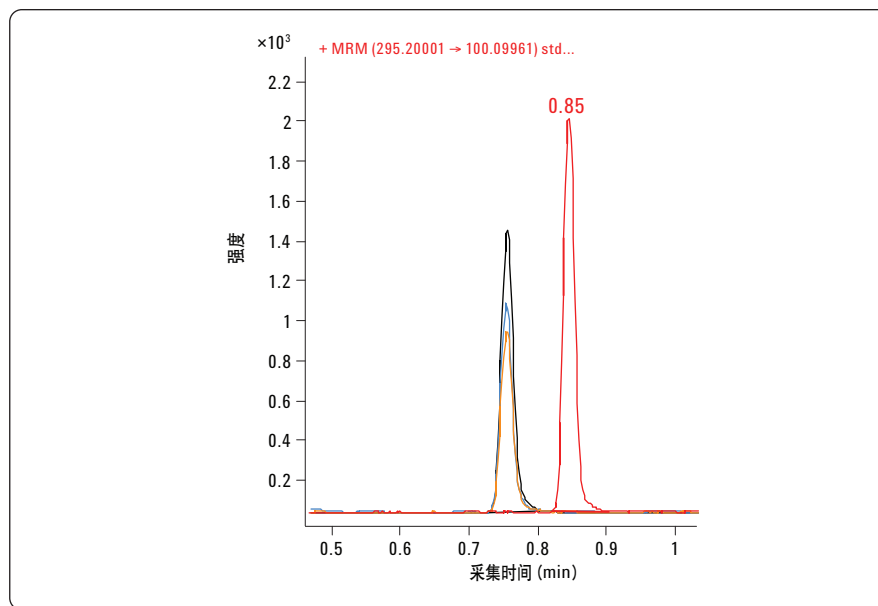


图 1
高通量分析示意图: 血浆中 500 μ g/mL 去甲替林和内标 (图中红色峰) 的 MRM 谱图及去甲替林的定量 (图中黑色) 和定性 (图中蓝色和橙色) 离子谱图

灵敏度

图 2 为第 1 天内去甲替林在人体微量水平分析典型浓度范围内 (1 - 500 pg/mL 血浆) 的校准曲线。可以看出线性良好, 相关系数 R^2 趋近于 1 (0.9999)。图 3 是对应的 MRM 谱图。图中上方的谱图 (bl) 对应的是空白提取溶液的结果。在去甲替林和内标物出峰位置无干扰峰出现, 表现出选择性。1 pg/mL 的去甲替林提取溶液 (柱上绝对量约 4 fg) 出现显著峰, 且信噪比良好 (例如, 信噪比 $S/N = 14$, 即信号高度与噪声的比, 此时噪声为 0.1–0.7 和 0.8–1.3 范围内的 RMS 的 3 倍)。

系统耐用性/重现性

对血浆基质连续进样分析后, 一些非挥发性基质成分会在 MS 进样口处富集, 从而影响生物分析方法的重现性。系统的耐用性对于超高灵敏度分析 (如人体微量研究分析) 尤其重要。

安捷伦公司专利的正交喷雾电离源 (如 ESI、APCI、MMS 或 APPI) 经专业设计, 可以提供最佳的信噪比和可靠的操作特性, 确保高灵敏度分析的重现性。安捷伦 6460 QQQ 中配备的安捷伦喷射流技术可以让设备在较少维护的情况下达到更高的检测灵敏度。

为了证实其耐用性, 在 5 个工作日内完成了一个超过 1000 个血浆样本的分析序列 (如每天进样 200 次)。每完成 200 个样本, 都会用标样系列进行评估。

注: 每天进样前用甲醇清洗 MS 进样口。

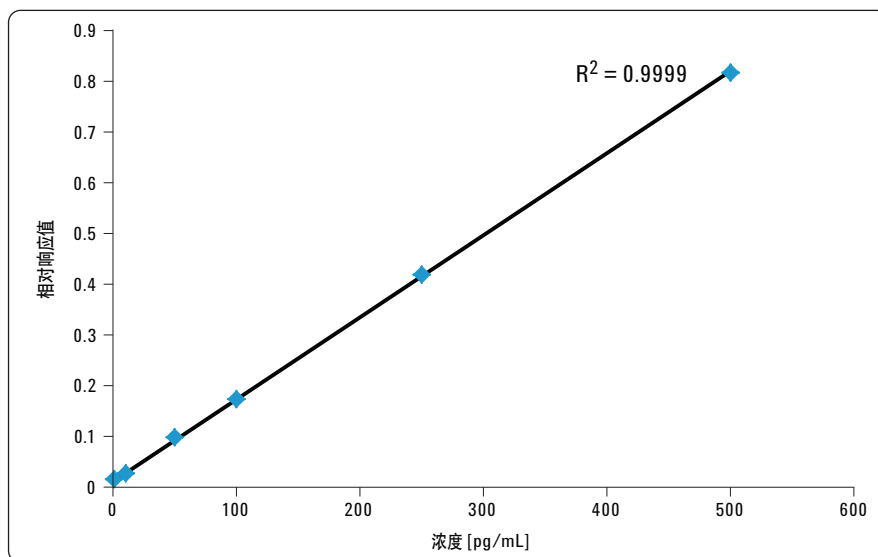


图 2 在人体微量水平范围内的灵敏度和线性。1000 个血浆样本的五天试验中, 第一天分析的去甲替林相对响应值 (去甲替林/ISTD) 对血浆中去甲替林浓度作图。

图 3 A 中显示了去甲替林在第 1、2 和 5 天时的 MRM 谱图，在 5 天的实验中，系统的性能，包括保留时间、峰形、峰面积、峰高以及信噪比在该极低水平定量中均无显著变化。图 3 A 中 bl 第 1/5 天表示的是第 1 天和第 5 天校准系列样品分析前空白进样的叠加谱图，可以看出信号没有明显变化。

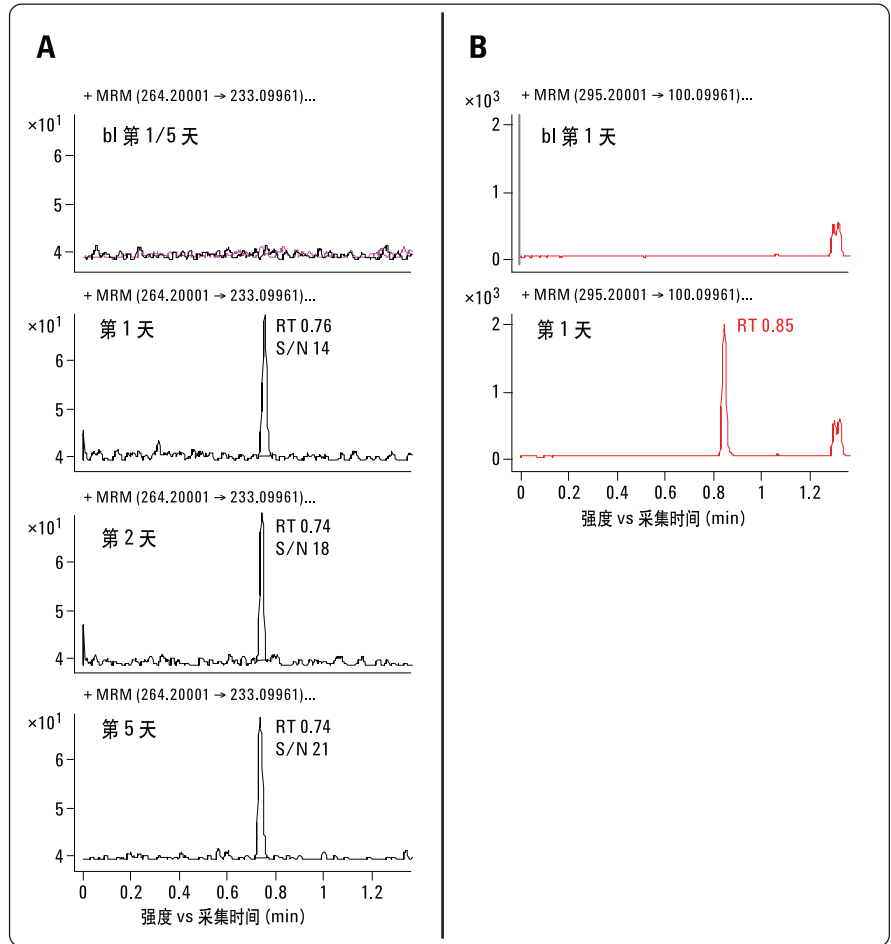


图 3

灵敏度和系统重现性。血浆中极低浓度水平 (1 pg/mL) 去甲替林的 MRM 谱图。A: 在 5 天时间里分析了超过 1000 个血浆样本的实验中，第 1、2、5 天时去甲替林的分析结果。bl 第 1/5 天: 第 1 天 (黑色) 和 第 5 天 (紫色) 校准系列之前空白进样的图谱的叠加。B: 内标结果。RT 为保留时间，S/N 为信噪比，噪音 = 3 × (0.1–0.7 和 0.8–1.3 之间的 RMS)。

图 4 表示的是 5 天实验中每天的校准曲线叠加图，相关系数 $R^2 = 0.9996$ ，表明日间重现性良好。相对响应值无明显变化（例如， $RSD [1 \text{ pg/mL}] = 2.4\%$ ）。

图 5A 为计算浓度对预期浓度作图，相关系数 $R^2 = 0.9997$ ，表明尽管 5 天之内分析了超过 1000 个血浆样本，但检测准确度没有变化。

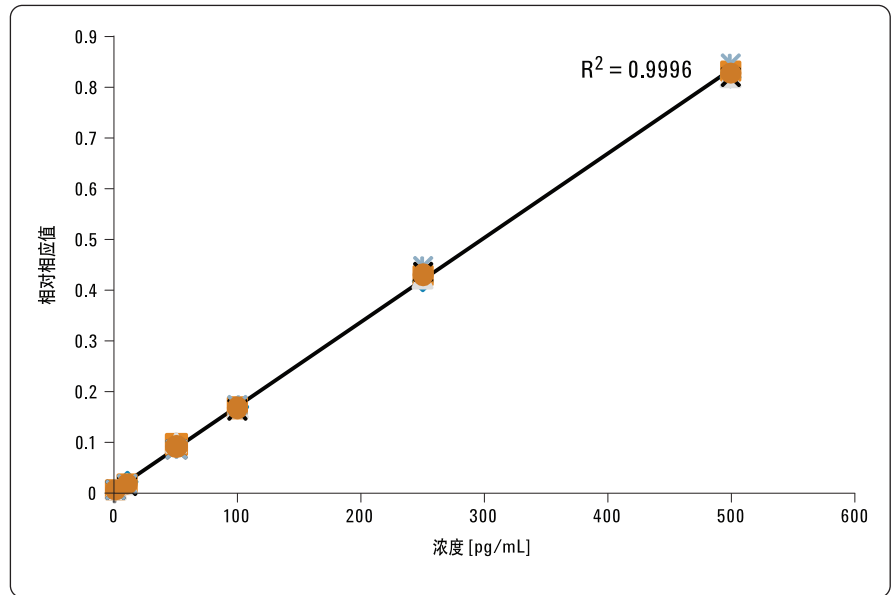


图 4
系统耐用性。在分析超过 1000 个血浆样本时 5 个校准曲线（如图 1）的叠加图， R^2 由平均响应值计算得出。

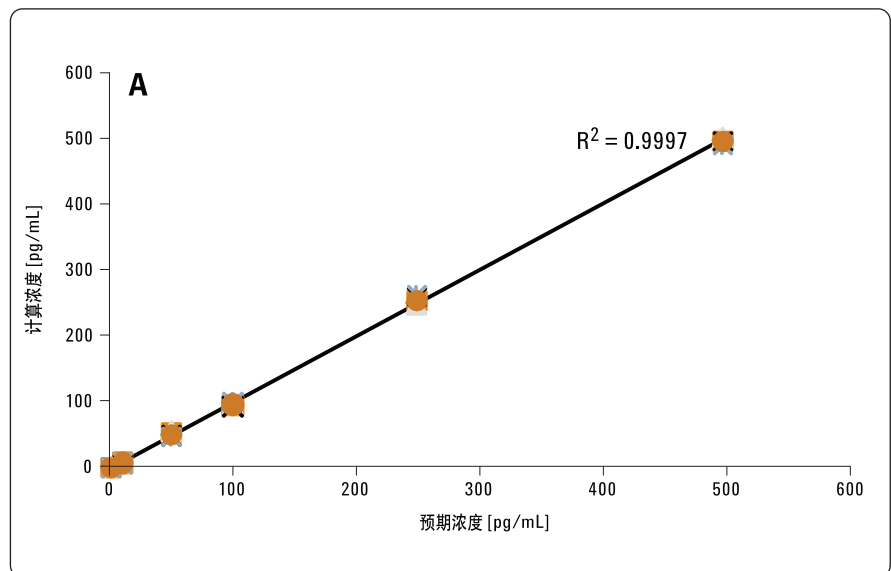


图 5A
准确度稳定性。A: 从校正曲线得到的计算浓度 vs 图 4 中曲线相应的预期浓度的 5 个曲线的叠加图， R^2 以平均值计算。

图 5B 表示即使最低水平 (1 pg/mL) 的去甲替林定量, 准确度百分比变异也很小, 只有第 2 天时超过了 10%, 但也符合 FDA 规定的允许标准, 即最低定量限 (LLOQ) 的准确度在 80%到 120%之间¹²。在高浓度水平 (此处为 500 pg/mL), 检测结果没有明显差异。5 天实验中 1 pg/mL 和 500 pg/mL 的 RSD 值分别为 7.5% 和 0.8%。

结论

制药行业在血浆的药代动力学 (PK) 试验中需要高通量、超高灵敏度和高耐用性的分析方法, 以便快速作出决定并尽可能以最低的研发成本淘汰非药物候选物。

本应用简报反映出安捷伦 1200 系列 RRLLC 系统结合 6460A QQQ 可以完全满足这些需求。

高通量: 从血浆中提取出来的两种药物能够在 1 分钟之内得到良好的洗脱 (见图 1)。

超高灵敏度: 在人体微量水平研究的典型浓度范围内 (1–500 pg/mL 血浆) 进行了定量分析。最低定量水平 (柱上绝对量为 4 fg) 的信号也有很好的信噪比 (图 3), 线性非常好, 相关系数 $R^2 = 0.9999$ (图 2)。

耐用性/重现性: 在 5 天的时间内对超过 1000 个血浆样品用 LC/MS 进行分析, 每进样 200 次运行一次校准系列, 以验证系统性能 (图 4 显示线性, 图 5 显示准确度, 图 3 给出了 5 天内最低定量水平的信号)。表明系统性能相当稳定。

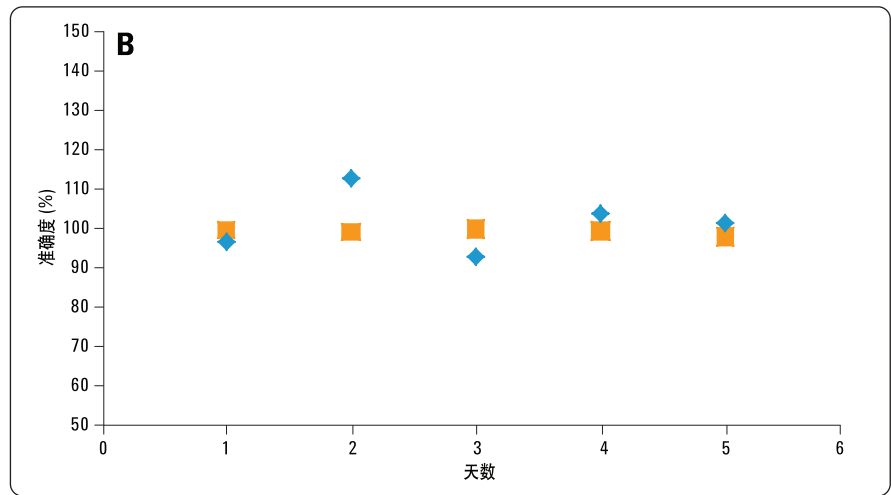


图 5B

精密度稳定性。B: 五天时间中, 在最低 (1 pg/mL, 蓝色) 及最高 (500 pg/mL, 橙色) 定量水平下的准确度百分比的变异情况。

参考文献

1. Mike S. Lee, "LC/MS Applications in drug development," Wiley-Interscience, 2002.
2. Rang H.P., "Drug Discovery and Development - Technology in Transition," Elsevier Limited, 2006.
3. I. R. Wilding, J. A. Bell, "Improved Early Clinical Development through human microdosing studies," DDT, 2005, 10, 890-894.
4. N. Yamane, et al., "Microdose Clinical Trial....," *J.Chromatogr.B*, 2007, 858, 118-128.
5. "European Agency for the Evaluation of Medicines for Human Use (EMA), Position Paper on the Nonclinical Safety Studies to Support Clinical Trials with a Single Microdose," CPMP/SWP2599/0, 28 January 2003.
6. "Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers Exploratory IND Studies," Food and Drug Administration, January 2006.
5. G. Lappin, et al., "Use of Microdosing to predict Pharmacokinetics at the therapeutic Dose: Experience with 5 drugs," *Clinical Pharmacology Therapeutics*, 2006, 80, 203-215.
8. S. Pedraglio, et al., "New Perspectives in Bio-Analytical Techniques for Preclinical Characterization of Drug Candidate: UPLC-MS/MS in *In-Vitro* Metabolism and Pharmacokinetic Studies," *J.Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 44, 665-673.

9.
J. Zweigenbaum, J. Henion,
"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.

10.
D. A. Wells, "High Throughput
Bioanalytical Sample Preparation -
Methods and Automation Strategies"
Elsevier Limited, 2003.

11.
M. Frank, "Improving the Productivity of
Pharmacokinetic Parameter
Determination," Agilent Technologies
publication 5989-7648EN.

12.
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

www.agilent.com/chem/qqq:cn

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2009
2009年4月1日
5990-3823CHCN



Agilent Technologies