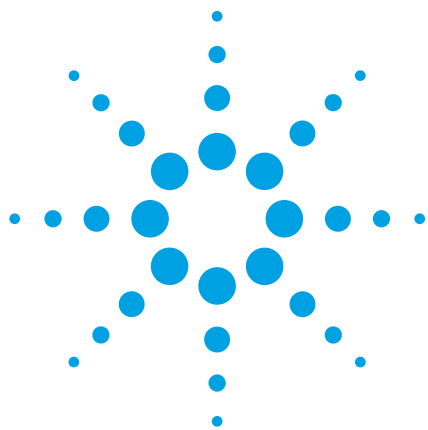




采用高分离度快速液相色谱和三重串联四极杆质谱进行多种药物血浆稳定性的快速方法开发和研究

应用摘要

新药发现

作者

Srividya Kailasam

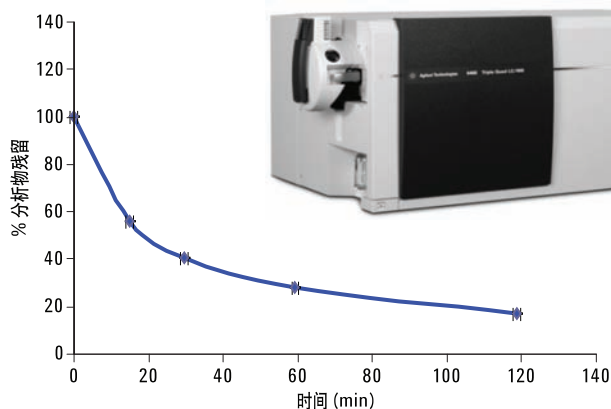
安捷伦科技公司

班加罗尔

印度

Kerry Frost

Cyprotex Discovery 有限公司



摘要

本应用摘要采用高分离度快速液相色谱与串联质谱法联用，研究了四种不同种类药物的血浆稳定性。Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统（RRLC）可提供所有样品中化合物和内标的快速分离。Agilent MassHunter Optimizer 软件可得到化合物的优化的 MS 参数，如最高丰度的子离子、最佳碎裂电压和碰撞能量。综合以上技术，在很短的时间周期内可建立用于更多化合物的稳定的分析方法。

引言

稳定性差的化合物往往生物利用度低。特定官能团（如酰胺、酯以及内酯等）有利于使化合物成为血浆酶（如水解酶和酯酶）的靶标。对新化学实体（NCE）血浆稳定性曲线的研究有助于对其分子结构进行修饰以改善物理化学性质，并且可为后续研究开发选择更适合的分子。

本研究中，快速分离 LC/MS/MS 用于研究十种药物化合物的血浆稳定性。其中包括四种 β 受体阻滞剂（阿替洛尔、拉贝洛尔、美托洛尔和普萘洛尔）、一种钙通道阻滞剂（维拉帕米）、一种 5-羟色胺受体激动剂（丁螺环酮）和四种抗抑郁药（奈法唑酮、去甲替林、丙咪嗪和曲米帕明），该分析采用利血平作为内标。尤卡托品是一种眼科药物，被用作对照样，以美托洛尔为内标进行分析。

实验部分

试剂和药品

阿替洛尔、拉贝洛尔、美托洛尔、普萘洛尔、丁螺环酮、奈法唑酮、去甲替林、丙咪嗪、曲米帕明、维拉帕米、尤卡托品和

利血平购自印度班加罗尔的 Sigma-Aldrich 公司。HPLC 级乙腈和甲醇均购自 Lab-Scan 公司。甲酸购自 Fluka 公司。

用于方法开发的目标分析物的储备液和标准溶液用甲醇进行配制。

样品制备

血浆用 0.1M 的盐酸或 0.1M 的氢氧化钠调节 pH 值到 7.4。待测化合物溶解在 DMSO（二甲基亚砜）中，终浓度为 10mM，然后用 DMSO 稀释至 40 μ M。孵育实验中待测化合物的浓度为 1 μ M，DMSO 的终浓度为 2.5%。将 195 μ L 的血浆加入一个 96 孔板，然后分别加入 5 μ L 待测化合物。

加标血浆样品于 37°C 孵育 2 小时。分别在 0、15、30、60 和 120 分钟时加入 400 μ L 利血平（内标）甲醇溶液终止反应。同时，含有尤卡托品（对照化合物）的血浆样本加入 400 μ L 美托洛尔（内标）甲醇溶液终止反应。此外，将仅含内标的甲醇溶液加入血浆样品，制备不含任何被分析物或对照化合物的基质空白。样品板在 4°C，2500rpm 离心 45 分钟，上清液转移到一个新的 96 孔板供 LC/MS-MS 分析。

仪器

Agilent 1200 系列快速分离液相色谱系统（包括一个微型真空脱气机、二元泵、带温控系统的高性能自动进样器和柱温箱）与 Agilent 6460 三重串联四极杆质谱仪联用。质谱仪为 ESI 模式，采用安捷伦喷射流技术。采用 Agilent MassHunter 工作站（版本 B.02.00）进行数据采集，MassHunter 定量分析软件（版本 B.01.04）进行数据分析。采用 Agilent MassHunter Optimizer 软件（B.02.00）优化两个重要的 MS 参数：碎裂电压和碰撞能量。Optimizer 还可给出本研究中丰度最高的 MRM 离子对。

方法详情

所有被分析物和对照样品的 LC 条件列于表 1。

参数	详细信息
流动相	A: 水 (0.1% 甲酸) B: 乙腈 (0.1% 甲酸)
流速	0.5mL/min
梯度条件	0min 20 % B 0.2min 50 % B 0.3 - 0.5min 70 % B 0.6 - 1.2min 95 % B 1.25 - 1.5min 20 % B
分析时间	1.5min
运行后时间	1min
进样量	1µl
洗针	1:1 甲醇/水混合液洗 10 秒
色谱柱	Agilent Zorbax Eclipse XDB - C18, 2.1×50mm, 1.8µm 粒径 (P/N 927700-902)
柱温	50°C

表 1
LC 条件。

利血平在本研究中用作被分析物的内标，
美托洛尔用作对照样品尤卡托品的内标。
用于包括对照样品和两个内标在内的所有
化合物离子化的 MS 条件列于表 2。

参数	详细信息
离子化模式	采用安捷伦喷射流技术的正离子模式 ESI 源
干燥气温度	350°C
干燥气流速	10L/min
雾化气压力	20Psi
毛细管电压	2000V
鞘气温度	400°C
鞘气流速	11L/min
喷头电压	0V
Q1 分辨率	Unit
Q2 分辨率	Unit

表 2
MS 条件。

MassHunter Optimizer 可根据化合物确定 MS 参数，如最佳碎裂电压、给定母离子的最高丰度子离子以及相关的碰撞能。本研究中采用的 MRM 离子对列于表 3。所有离子对的驻留时间为 50ms，这样可为每个峰提供 50 个以上的数据点。

化合物	经验化学式	母离子	子离子 定量, 定性	碎裂电压 (V)	碰撞能 (eV) 定量, 定性
阿替洛尔	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	267.2	145, 190	115	25, 13
拉贝洛尔	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₃	329.2	311.1, 294.1	105	5, 13
美托洛尔	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	268.2	116.1, 74.1	115	13, 17
普萘洛尔	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	260.2	116.1, 183	110	13, 13
丁螺环酮	C ₂₁ H ₃₁ N ₅ O ₂	386.3	122, 150	164	29, 29
维拉帕米	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	455.3	165, 303.1	158	25, 21
奈法唑酮	C ₂₅ H ₃₂ ClN ₅ O ₂	470.2	274.1, 246.1	150	25, 33
去甲替林	C ₁₉ H ₂₁ N	264.2	233.1, 90.9	80	10, 20
丙咪嗪	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	281.2	86.1, 58.1	101	13, 39
曲米帕明	C ₂₀ H ₂₆ N ₂	295.2	100.1, 58.1	105	9, 41
尤卡托品	C ₁₇ H ₂₅ NO ₃	292.2	58.1	120	21
利血平	C ₃₃ H ₄₀ N ₂ O ₉	609.38	195.1	150	41

表 3
MS/MS 参数。

数据分析

每个样品重复进样五次。计算了不同时间点的相对响应（分析物浓度/内标浓度）的平均值。每个时间点的平均相对响应相对于 0 分钟（T₀）时的平均相对响应进行了归一化处理。归一化值（百分比）与孵育时间作图，得到血浆稳定性曲线。

结果与讨论

该筛选分析可发现相对于 0 分钟时的初始浓度，样品血浆浓度发生的所有改变。因此，没有必要确定每个样品中药物的确切含量。计算得到了各个时间点相对于 0 分钟的母药残留百分比。如果与 0 分钟时相比，化合物在所有时间点的残留百分比的变化在 ±15% 以内，可以认为该化合物在血浆中是稳定的。

图 1A 显示了目标化合物去甲替林的定量离子和定性离子转化的两个重叠色谱峰，以及内标利血平的 MRM 转化色谱峰。图 2A 显示了尤卡托品及其内标美托洛尔的 MRM 转化色谱峰。1.5 分钟的短运行时间使得多个样品的快速分析成为可能。

该技术的选择性可以从图 1B 和图 2B 中看出，图 1B 和图 2B 分别是样品和空白对照的 MRM 色谱图。两张图中丰度最高的色谱峰分别代表两个内标利血平和美托洛尔（定性离子和定量离子）。没有明显的对照化合物或目标化合物的色谱峰。

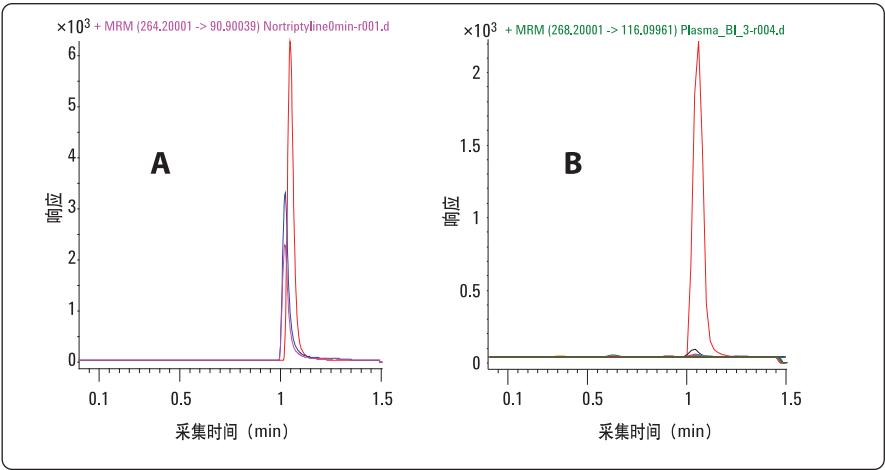


图 1A
去甲替林和利血平 (IS) 的 MRM 色谱图。
图 1B
空白血浆样品，只含利血平 (IS)。

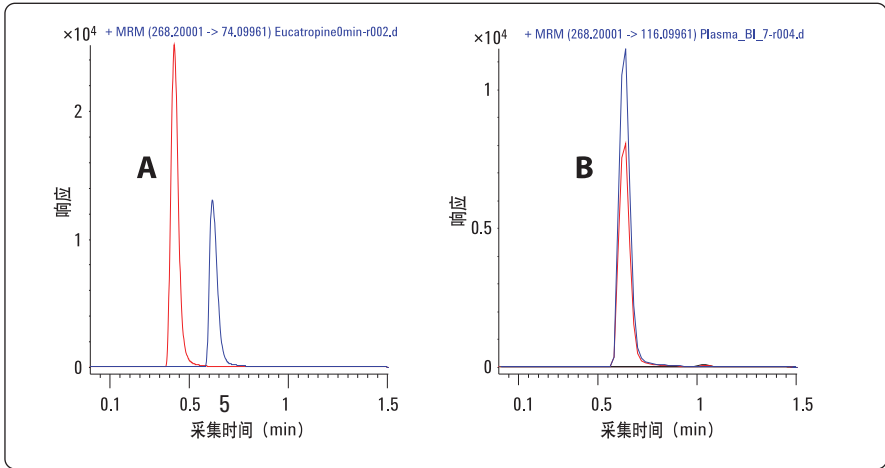


图 2A
对照样品尤卡托品和美托洛尔 (IS) 的 MRM 色谱图。
图 2B
空白血浆对照，只含美托洛尔 (IS)。

图 3 描绘了对照化合物尤卡托品以及两个目标化合物的血浆稳定性。开发的方法能够成功地追踪已知的尤卡托品稳定性特点 [1]。血浆中去甲替林发生了降解，而美托洛尔被认为在血浆中能够稳定存在长达两个小时。尽管进样精度极佳 ($CV < 15\%$)，不同孵育时间的血浆浓度仍发生波动，这与已有的报道类似 [2]。对于筛查实验， $\pm 20\%$ 的浓度偏差可以接受。所有的目标分析物和对照化合物的血浆稳定性见表 4。

化合物	血浆稳定性
阿替洛尔	稳定
拉贝洛尔	稳定
美托洛尔	稳定
普萘洛尔	不稳定
丁螺环酮	稳定
维拉帕米	稳定
奈法唑酮	稳定
去甲替林	不稳定
丙咪嗪	稳定
曲米帕明	稳定
尤卡托品	不稳定

表 4
血浆稳定性特征。

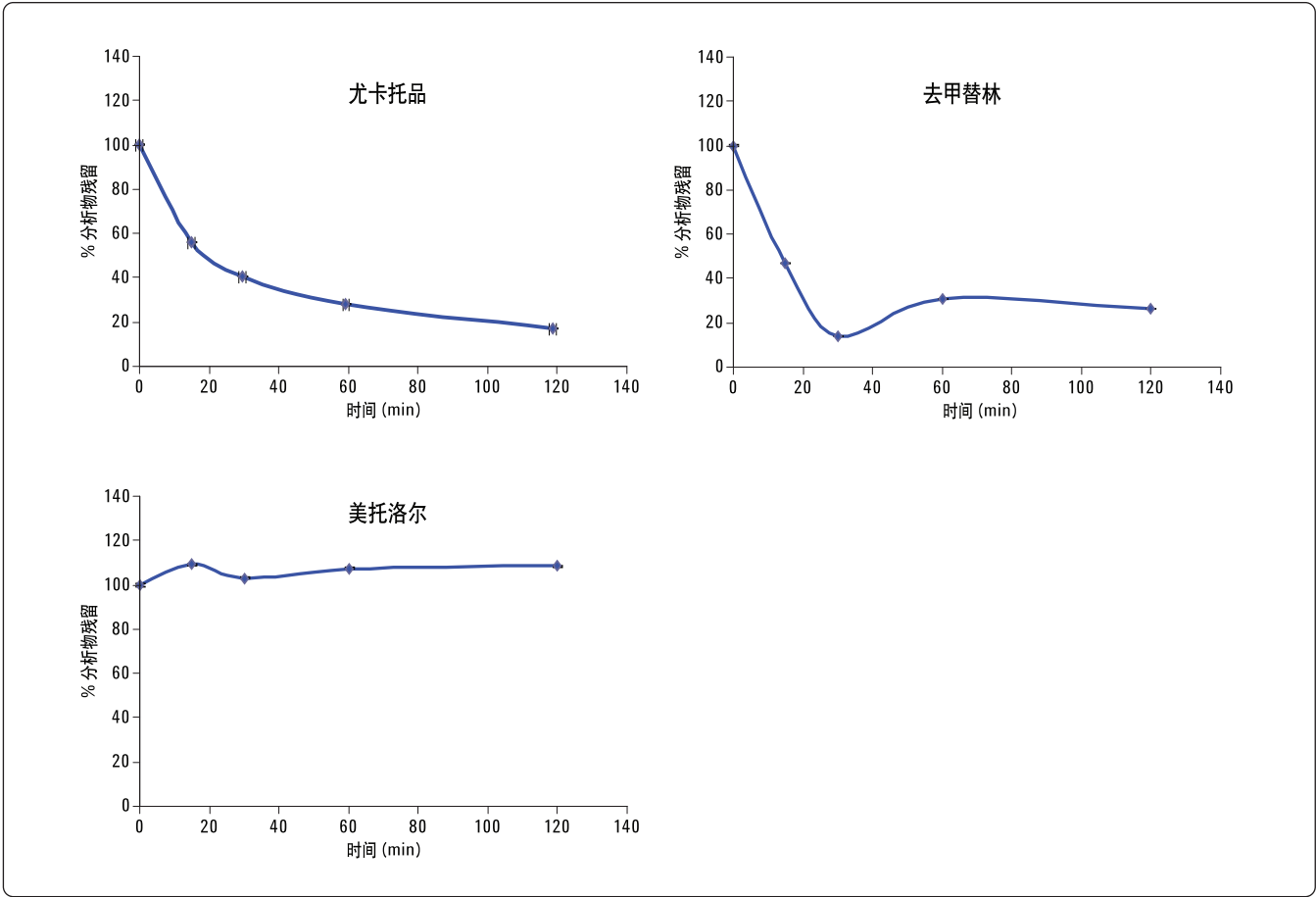


图 3
三个被分析物的稳定性曲线。

结论

本文建立了评价十种药物化合物血浆稳定性的 LC 方法和质谱条件。采用 MassHunter Optimizer 软件确认选定母离子的响应最强的子离子。该软件也给出了最佳的碎裂电压和碰撞能量。这样，很快地建立了标准品的质谱分析方法。研究表明，本文建立的方法可用于不同种类化合物的血浆稳定性考察。

参考文献

1.
Di, L., Kerns, E. H., Hong, Y. and Chen, H., "Development and application of high throughput plasma stability assay for drug development", International Journal of Pharamaceutics, 297 (2005) 110 -119.
2.
http://www.cyprotex.com/assay_reports/Cloe_Screen_Plasma_Stability.pdf, Cyprotex, Cloe Screen Plasma Stability flyer

www.agilent.com/chem/qqq:cn

©安捷伦科技（中国）有限公司，2009
2009 年 10 月 1 日，中国印刷
出版号 5990-4603CHCN



Agilent Technologies