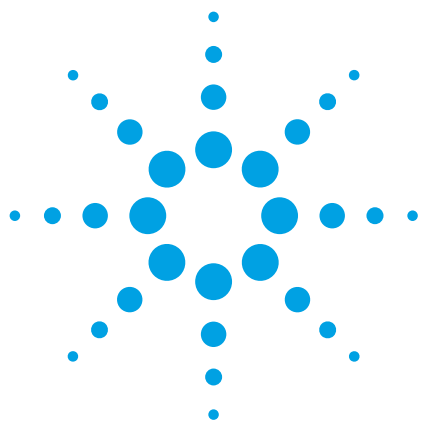




采用干血斑技术结合超高效液相色谱和增强型离子生成 ESI 技术简化药代动力学分析

应用简报

作者

Stephan Buckenmaier
安捷伦科技研发和市场有限两合公司
Waldbronn, 德国

Keith Waddell
安捷伦科技公司
美国加州圣克拉拉, 美国

摘要

本应用简报介绍了 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统与 Agilent 6460A 三重串联四极杆 LC/MS 系统联用的分析性能。

内容包括：

- 采用干血斑（DBS）技术在仅 15 μL 的全血中提取一系列药物
- 采用新型 ZORBAX 超高压快速高分离度（RRHD）亚 2 μm 粒径色谱柱在接近 1200 bar 的反压下进行快速色谱/质谱分离
- 在不到 50 秒的时间内实现七种小分子药物混合物的高效分离
- 极高的检测灵敏度



Agilent Technologies

引言

采用 LC/MS/MS 技术进行生物分析中的定量检测可能被认为是药代动力学 (PK) 筛查的里程碑。临床前在体内药物筛查包括以先导化合物向大量动物 (一般为小鼠或大鼠) 给药, 并监测动物血清中的药物随时间的吸收和衰减。现在, 在早期药物发现阶段即需进行 PK 分析, 这样就能够以预先找出最有可能通过后续药物开发阶段的新型化合物 (NCE), 并针对它展开接下来的工作。然而, 考虑到可能面对的大量的 NCE, 必须尽早迅速、廉价地剔除其中的非药物化合物, 因此需要很短的样品处理周期¹。

“盒式给药法” (又名“鸡尾酒”或 “N-in-one”) 是一种广泛用于加快 PK 筛查的给药方法。是指以几种药物对同一实验动物进行同步给药。这种平行测试方法有利于减少动物消耗、动物处理、以及样品制备和分析时间。还可以平息伦理上的争议, 并可节约相当的成本¹⁻⁴。

本文对含有六种药物的组合药物进行了 LC/MS/MS 生物分析。主要目的是得到不牺牲色谱分离度和/或灵敏度前提下的最高分析性能。研究中使用了一台配备 RRHD 短柱 (50 x 2.1 mm ID, 1.8 μ m) 的 Agilent 1290 Infinity LC 系统, 在柱压为 1200 bar 时, 流速最高可达 2 mL/min⁵。该 LC 系统与 6460A 三重串联四极杆 LC / MS 联用可提供极高的灵敏度以及高流速条件下无需分流即可进行质谱分析的能力。安捷伦喷射流技术可以提供上述的高流速⁶。

采用干血斑 (DBS) 技术⁷⁻¹⁰ 从小体积全血样品中提取组合药物。与传统的临床前和临床分析血浆取样技术相比, DBS 技术有其独特的优点。例如, 在临床前研究实验室, 由于制备 DBS 样本对血液量的要求较低, 因此在实验动物数量减少的情况下仍然能够实现连续采血, 这有助于消除个体差异。除相关的伦理和费用方面的优势外, 该技术还可提高 PK 数据的质量。

实验部分

试剂

所有标准品 (右美沙芬、维拉帕米、甲氧戊脉安、丙咪嗪、阿米替林、普罗替林和曲米帕明 (ISTD)、甲酸 (FA)、三氟乙酸 (TFA)) 均购自 Sigma-Aldrich 公司 (德国)。HPLC 级水购自 Burdick & Jackson 公司 (美国)。HPLC 级乙腈 (ACN) 和甲醇 (MeOH) 购自 Merck 公司 (德国)。

样品制备

用乙腈/水 (50:50 V/V) 将各化合物分别制备成约 2 mg/mL 的溶液。将这七种储备液 I 混合, 使其中六种待测药物浓度相等 (100 μ g/mL), 得到储备液 II。将储备液 II 稀释得到空白和浓

度在 0.5ng/mL 到 5000ng/mL 范围内的一系列标准溶液。在 90 μ L 大鼠血中加入 10 μ L 不同浓度的标准溶液, 得到相应的空白和浓度为 0.05ng/mL 到 500ng/mL 的样品溶液。

DBS 提取步骤

FTA Elute MicroCard (FTA 卡) 购自 Whatman (英国)。图 1 显示了 15 μ L 的血液加标样品的干血斑 (左)。用 Harris Uni-Core 打孔器 (Sigma-Aldrich, 德国) 从干血斑上取下 6mm 直径的样品点。如图 1 所示, 打孔器取样后血斑边缘仍然存在 (右)。样品点被放入一个 2ml 离心管中, 加 100 μ L 的乙腈/水 60:40 v/v (2% FA)。涡流混合几秒后, 超声提取 15 分钟。在 15000 rpm 下离心后, 将血斑提取液转移到干净的样品瓶。为了简化样品制备过程, 不对 60% 的乙腈提取物进行复溶和稀释, 而是直接向 LC/MS 系统进样。

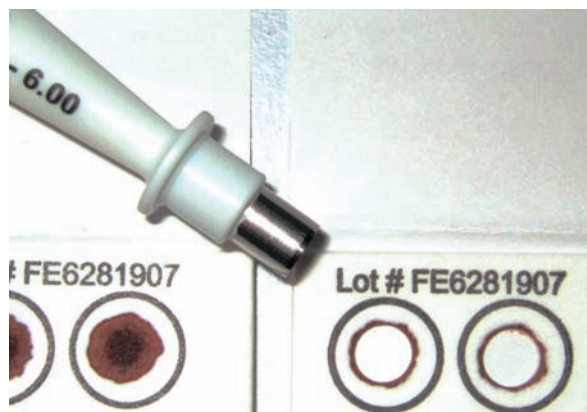


图 1: FTA 卡和 6 mm 直径打孔器图。左: 15 μ L 的血斑。
右: 6 mm ID 打孔器提取后的干血斑。

设备

- Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，由内置脱气机的 1290 Infinity 二元泵、带温控器的 Infinity 1290 自动进样器和 1290 Infinity 柱温箱组成
- 采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460A 三重串联四极杆的 LC/MS 系统
- 安捷伦 MassHunter Workstation 软件，用于仪器控制、数据采集和数据处理
- 安捷伦 MassHunter Optimizer 软件
- 安捷伦超高压快速高分离度（RRHD）ZORBAX Eclipse Plus - C18 色谱柱，2.1 x 50mm，1.8µm

Agilent 1290 Infinity 方法

溶剂 A:	水 [0.1%甲酸]
溶剂 B:	甲醇 [0.1%甲酸]
梯度:	t (min) % B
	0 40
	1 60
	1.2 90
	1.7 90
	1.9 40
流速:	1 mL/min
T (色谱柱):	50°C
停止时间:	2 分钟
后运行时间:	1 分钟
进样量:	3 µL
洗针:	15 秒 乙腈/水 60/40 v/v (0.1% TFA)

Agilent 6460A 三重串联四极杆 LC/MS 工作条件

扫描模式:	MRM (采用 MassHunter Optimizer 软件得到表 1 中的参数设置)
电离方式:	采用安捷伦喷射流技术的正离子 ESI
干燥气温度:	300°C
干燥气流量:	11 L/min
雾化器压力:	35 psig
毛细管电压:	2250 V
鞘气温度:	400°C
鞘气流量:	12 L/min
喷嘴电压:	0 V

化合物	ISTD	母离子	MS1 分辨率	子离子	MS2 分辨率	驻留	碎裂电压 (V)	CE (V)	计量离子
右美沙芬 (DM)		272.2	Unit	171.1	Unit	5	142	40	X
		272.2	Unit	215.1	Unit	5	142	20	
维拉帕米 (V)		455.3	Unit	165.1	Unit	5	176	26	X
		455.3	Unit	303.2	Unit	5	176	24	
甲氧戊脉安 (MV)		485.3	Unit	165.1	Unit	5	170	28	X
		485.3	Unit	184.2	Unit	5	170	16	
丙咪嗪 (I)		281.2	Unit	86.1	Unit	5	114	12	X
		281.2	Unit	58.1	Unit	5	114	44	
普罗替林 (P)		264.2	Unit	191.1	Unit	5	128	24	X
		264.2	Unit	155.1	Unit	5	128	16	
阿米替林 (A)		278.2	Unit	91.0	Unit	5	118	24	X
		278.2	Unit	105	Unit	5	118	20	
曲米帕明 (T)	X	295.2	Unit	100.1	Unit	5	126	12	X

表 1: 由 MassHunter Optimizer 自动确定的 MRM 参数。

结果与讨论

高通量的组合给药样品分析

在复杂样品分离中实现高通量通常需要在分析速度和分离质量（即色谱分离度， R_s ）两方面进行权衡。图 2 (A) 说明了当前组合给药样品中相邻峰之间的分离度同流速之间的关系。在此图中，保持梯度洗脱时间不变，逐次将流动相流速调高。（研究表明在梯度洗脱时间不变时，提高流速可得到更好的分离度¹¹）。测试范围为 0.6 mL/min 到 1.75 mL/min，相应的最高柱压（ $p_{\max}$ ）为 470 bar 到 1160 bar；图 2 (A) 中也显示了柱压和流速的关系。

最高的流速可产生极快的分离速度，如图 2 (B) 所示，流速为 1.75 mL/min 时保留最强的化合物的保留时间仅为 27 秒（曲米帕明，7 号峰）。即使对于“单化合物”分析，这样的速度也意味着极高的分析通量。然而在组合给药的样品分析中，这种超快的流速是以牺牲分离度为代价的。正如图中所示的甲氧戊脉安和丙咪嗪这一对最接近的峰（图 2 中的峰对 3/4）的分离度。注：已报道的盒式给药研究往往忽略了色谱分离的需要，以避免离子抑制效应。

然而，图 2 (A) 表明，先进的技术使得快速且高品质的分离成为可能。流速在 0.6 mL/min 到 1 mL/min 之间时，大多数相邻峰都没有出现明显的分离度变化，即使是最接近的峰对 (3/4)，在 1 mL/min 时分离度仍可达到 1 左右。图 3 中的重叠 MRM 色谱图显示七个混合物标样可在 1 分钟内实现色谱分离（流速 1 mL/min； $p_{\max}$ = 740 bar；通常 R_s 大于 1； $RT_{\max}$ 等于 42 秒）。相应的分析时间为 3 分钟，该分析时间可与“单化合物”PK 分析相近（通常需要 3 到 5 分钟），而盒式给药样品分析往往需要更长的分析时间（不小于 6 分钟）²⁻⁹。

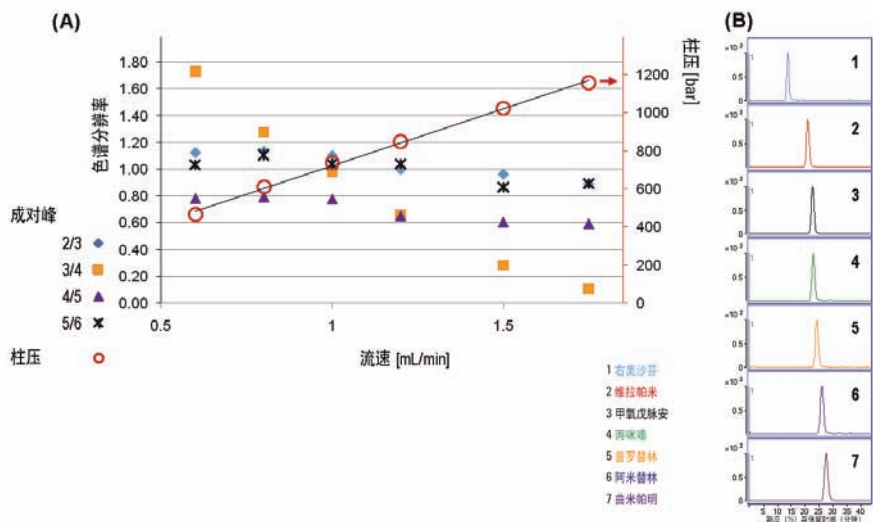


图 2: (A) 色谱分离度 (R_s , 左轴) 和最高柱压 (右, 红轴) 与流速的关系图。 $R_s = 1.18 \times [RT(2) - RT(1)] / [w_{0.5}(1) + w_{0.5}(2)]$, 其中 RT 为保留时间, $w_{0.5}$ 为半峰宽, (1) 和 (2) 分别表示先后洗脱的两个相邻峰。 (B) 流速为 1.75 mL/min 时七种化合物分离情况的 MRM 色谱图。

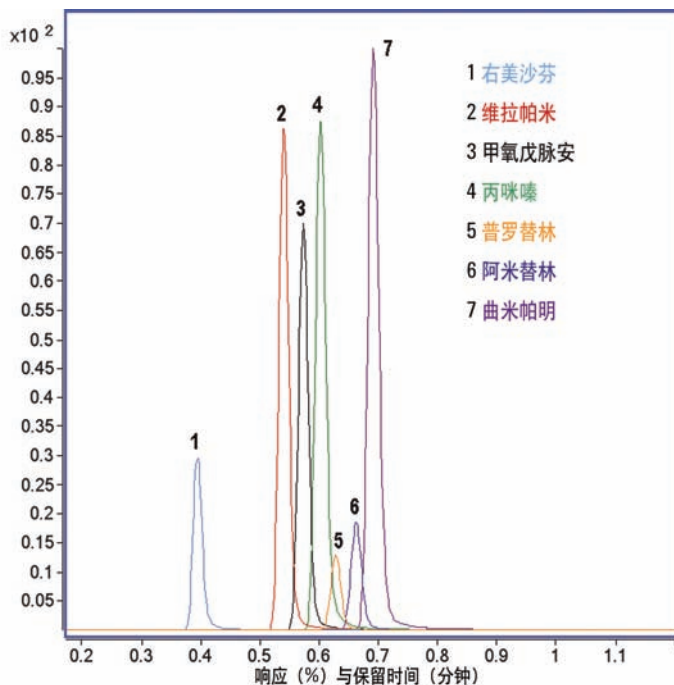


图 3: 六个化合物以及内标 (ISTD) 的分离质量的代表性 MRM 色谱图。本图显示了流动相流速为 1 mL/min 时 DBS 提取物的分离情况。其中 DBS 提取之前的组合药物浓度为 500 ng/mL。

线性和 LLOQ

图 4 给出了血液中丙咪嗪和阿米替林从最低定量限 (LLOQ) 到 500 ng/mL 的线性曲线。LLOQ 的计算根据以下 FDA 准则进行¹²: LLOQ 浓度的响应至少为空白响应的五倍, 且该响应是可识别的、明确的, 并能以 % RSD 小于等于 20% 的精密性、% 偏差 80% 到 120% 的准确度进行重复。表 2 总结了当前混合样品中各个化合物的 LLOQ 及其精密性和准确度值, 以及校准曲线的线性相关系数 (R^2)。

趋近一致的线性相关系数 R^2 说明线性良好。组合药物中各个化合物的 LLOQ 值在 0.05 ng/mL 到 0.50 ng/mL 之间, 具有出色的精密性和准确度值。例如, 丙咪嗪的 LLOQ 为 0.05 ng/mL, 精密性为 4.3% RSD, 准确度为 107.6%; 阿米替林的 LLOQ 为 0.50 ng/mL, 精密性为 9.5% RSD, 准确度为 99.7%。图 5 (A) 给出了两种化合物在 LLOQ 水平得到的定量离子的 MRM 轨迹 (蓝色), 并叠加了来自空白提取物的相同 MRM 轨迹 (紫色)。空白对照中在每种化合物各自被考察的保留时间处没有明显的干扰信号。图 5 (B) 为连续五次以 LLOQ 浓度进样的 MRM 叠加色谱图, 图中显示了得到的典型保留时间精密性 (对阿米替林和丙咪嗪, 分别为 0.066 和 0.088% RSD)。

注意: 常规的血浆分析方法需要为每个数据点采集大于 500 μ L 的血液样本。而在本文中我们模拟出的研究方法用量大大降低 (不到 100 μ L)⁹。尽管用量很低, 而且分析通量很高, 我们仍然得到了低浓度范围内与传统 PK 分析报道一致的 LLOQ 结果。

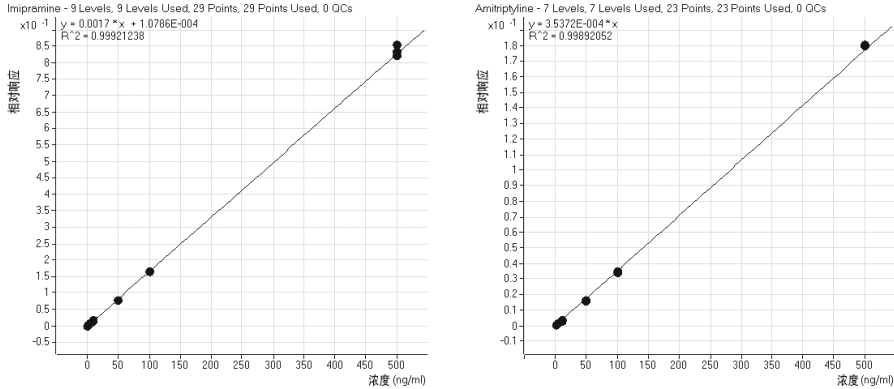


图 4: 丙咪嗪和阿米替林的相对响应 (等于被分析物响应与 ISTD 响应的比值) 与血样中被分析物浓度 (DBS 提取之前) 的关系。浓度范围分别为血样中 0.05 到 500 ng/mL 和 0.5 到 500 ng/mL。每组的最低定量限测定 5 次 ($n = 5$), 其它浓度测定 3 次 ($n = 3$)。曲线采用 $1/x$ 加权。

化合物	LLOQ [ng/mL]	精密性 $N \geq 5$ RSD [%]	平均准确度 [%]	R^2
右美沙芬	0.50	7.6	101.8	0.998
维拉帕米	0.10	8.3	106.4	0.999
甲氧戊脉安	0.10	10.5	93.8	0.999
丙咪嗪	0.05	4.3	107.6	0.999
普罗替林	0.50	9.7	97.9	0.997
阿米替林	0.50	9.5	99.7	0.999

表2: 被分析的组合药物中各个化合物的 LLOQ、精密性 (%RSD)、准确度 (%偏差) 和相关系数 (R^2) 汇总。

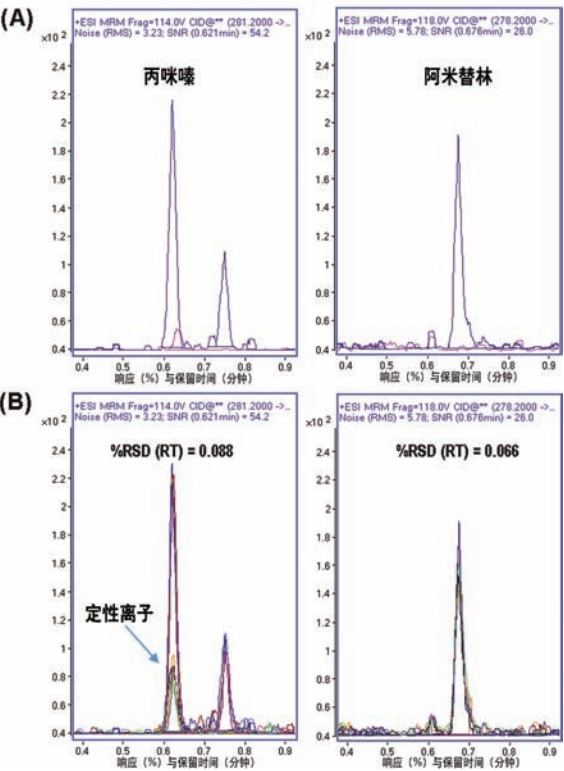


图5: (A) 全血中 0.05 ng/mL 和 0.5 ng/mL (DBS提取前) 的丙咪嗪和阿米替林的代表性定量色谱图 (蓝色)。空白提取物定量离子叠加色谱图 (紫色)。(B) 以 LLOQ 浓度水平连续五次进样的 MRM 叠加色谱图。对于丙咪嗪, 给出了定量和定性离子的轨迹。给出的值为保留时间 (RT) 的精密性值 (%RSD)。

DBS 提取的日内精密密度

通过在三个浓度水平（血中加标浓度为 0.5、10、100 ng/mL）对加标样品进行三次重复提取并分析，考察了方法的日内精密度和准确度。完整的验证不在本文的讨论范围内。图 6 为丙咪嗪和阿米替林的相对响应与浓度（对数坐标）的关系曲线。重复数据点显示为叠加的

蓝色三角形。表 3 总结了所有化合物的日内精密度和准确度结果。

精密度和准确度值的变化范围均在 15% 这一可接受的范围内¹²。此处获得的 0.50 ng/mL 浓度水平下的精密度和准确度进一步验证了表 2 中给出的某些 LLOQ 值。

基质效应

为了评估由同 DBS 相关的基质组分产生的离子抑制效应，将提取后加入内标的 DBS 提取物的 ISTD 响应与参考溶液中相同浓度的 ISTD 进行了比较。结果表明，基质效应因子为 0.7。

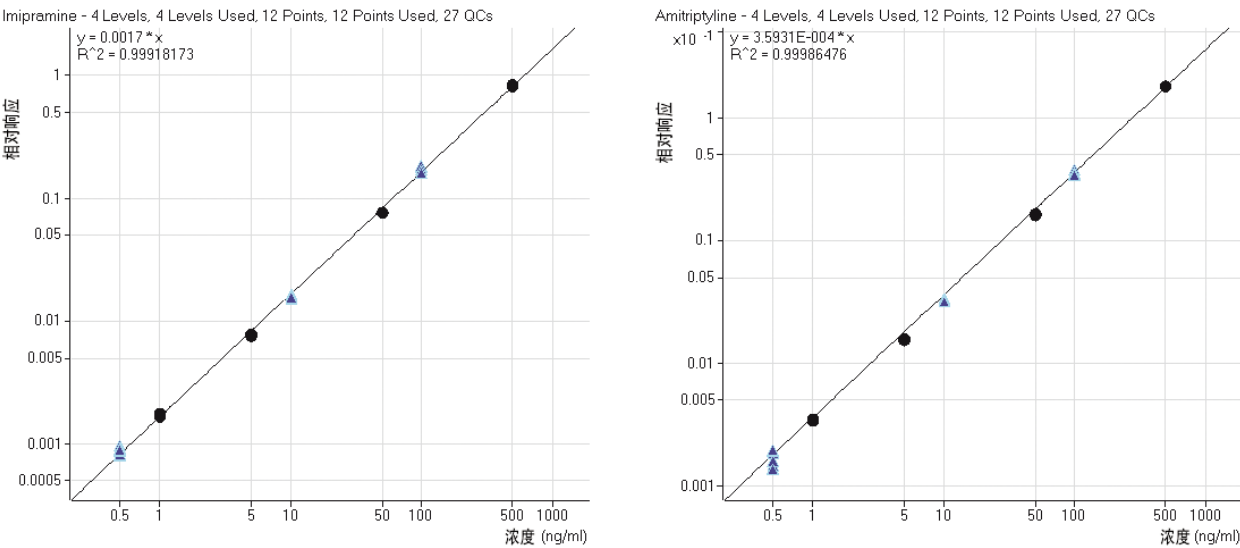


图 6：描述该方法日内精密度的曲线。DBS 提取前，血液中的丙咪嗪和阿米替林相对响应（对数坐标）与浓度的关系曲线，以及三个浓度水平（0.5、10、100 ng/mL 血样）（蓝色）重复进行 DBS 提取的结果。

化合物	标称浓度 [ng/mL]	平均测得浓度 [ng/mL]	日内精密密度 RSD [%]	平均日内准确度 [%]
右美沙芬	0.50	0.48	13.8	96.6
	10.00	10.38	2.0	107.6
	100.00	111.71	2.3	111.4
维拉帕米	0.50	0.54	7.5	108.6
	10.00	11.04	1.6	109.5
	100.00	111.61	2.9	111.6
甲氧戊脉安	0.50	0.50	10.0	100.1
	10.00	10.40	2.0	104.0
	100.00	109.12	3.2	109.1
丙咪嗪	0.50	0.46	6.4	92.0
	10.00	9.43	2.3	94.3
	100.00	104.72	4.5	104.7
普罗替林	0.50	0.47	12.9	94.5
	10.00	8.79	3.0	87.9
	100.00	98.18	5.9	98.2
阿米替林	0.50	0.47	11.6	95.7
	10.00	9.34	1.9	93.4
	100.00	102.16	4.8	102.2

表3：组合药物中样品三个浓度水平重复提取的日内精密密度（%RSD）和准确度（%偏差）结果。精密密度通过计算一个浓度水平的重复样品的相对标准偏差 %RSD 得到，准确度通过计算与理论浓度的相对偏差得到。

结论

本应用简报表明，先进的仪器是无需损失色谱分离或灵敏度进行超高效率分析的关键。

- 1290 Infinity 液相色谱拥有非常小的梯度延迟体积，可以在超高压力和流速条件下运行。
- 6460 三重串联四级杆应用了安捷伦喷射流技术，高流速条件下也不需分流。
- 采用 ZORBAX RRHD 亚 2 μ m 粒径的色谱柱，即使在快速分离条件下也可保证色谱分离的质量。
- 流速可达 1.75 mL/min，柱压接近 1200 bar。
- 可在 50 秒的时间内分析出 DBS 提取物中的 7 种化合物，同时保证良好的分离质量。
- 在超高通量条件下也能得到卓越的线性和 LC/MS 灵敏度。

参考文献

1. Lee M. S., "LC/MS Applications in Drug Development", Wiley-Interscience, 2002.
2. Smith N. F., Raynaud F. I., Workman P., Mol Cancer Ther. 2007, 6 (2), 428-440.
3. Ackermann, B. L., J Am Soc Mass Spectrom 2004, 15, 1374-1377.
4. Watanabe T., Schulz D., Morisseau C., Hammock B.D., Anal Chim Acta 2006, 559, 37-44.
5. 安捷伦出版物 5990-3669CHCN: UHPLC 争论尘埃落定
6. 安捷伦出版物 5990-4124CHCN: 安捷伦 6540 和 6538 型超高分辨率和质量精度的四极杆-飞行时间串联质谱仪
7. Barfield M., Spooner N., Lad R., Parry S., Fowles S., J Chrom. B 2008, 870, 32-37.
8. Liang X., Li Y., Barfield M., Ji Q. C., J Chrom. B 2009, 877, 799-806.
9. Spooner N., Lad R., Barfield M., Anal Chem 2009, 81, 1557-1563.
10. Buckenmaier S., Bonvie A., Emotte C., The Column 2009, 5(5), 20-24.
11. Petersson P., Frank A., Heaton J., Euerby M. R., J. Sep. Sci. 2008, 31, 2346-2357.
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

本文仅限研究使用，不可用于诊断目的。本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

安捷伦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不承担任何责任。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2009 年
2009 年 11 月 4 日，中国印刷
5990-4705CHCN



Agilent Technologies