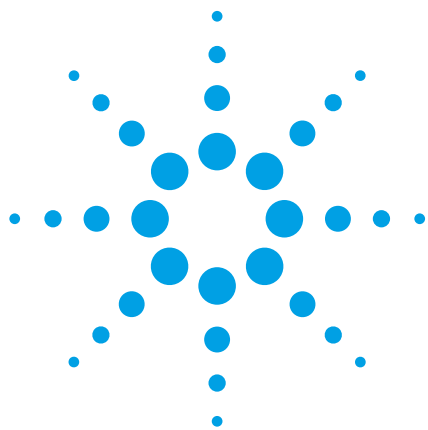




采用 Agilent 1200 系列 RRLC 系统和 Agilent 6460 三重串联四极杆液/质联用系统分析 PAMPA 样品

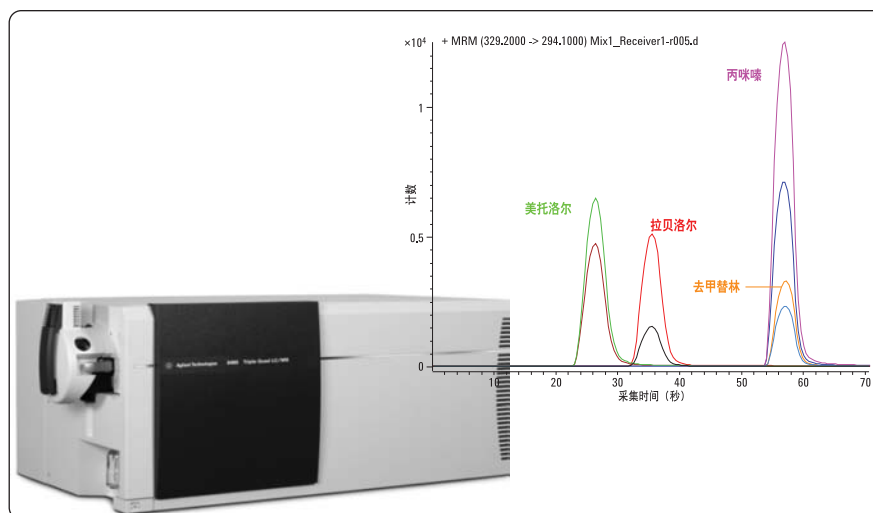
应用文摘

药物研发

作者：

Srividya Kailasam
安捷伦科技公司，
印度班加罗尔

Kerry Frost
Cypotex Discovery 有限公司



摘要

本应用文摘描述了联用 Agilent 1200 系列快速分离液相色谱系统和 Agilent 6460 三重串联四极杆液/质联用系统来分析平行人工膜渗透性测定（PAMPA）样品，所分析的每个样品包含四种目标化合物。采用 MassHunter Optimizer 软件确定强度最大的产物离子、最佳碎裂电压和碰撞能量。该实验测定了分别属于四类不同药物的十种药物化合物的表观渗透值。

引言

平行人工膜渗透性测定 (PAMPA) 用于确定化合物分子被动扩散透过多孔过滤膜的性能, 此多孔过滤膜由类脂有机化合物或者从动物中提取的天然脂质包被形成人工膜。通常, PAMPA 实验在药物研发阶段进行, 用以鉴定最有希望为肠道吸收的先导候选药物、改进研发化合物的结构以及改善体内扩散的特性。PAMPA 结合 Caco-2 细胞测定可以解释在体内观察到的药物渗透行为。

本研究测定了四种 β -受体阻滞剂 (阿替洛尔、拉贝洛尔、美托洛尔、普萘洛尔)、一种钙通道阻滞剂药物 (维拉帕米)、一种 5-羟色胺受体激动剂 (丁螺环酮)、四种抗抑郁药 (奈法唑酮、去甲替林、丙咪嗪、曲米帕明) 以及一种对照化合物 (地昔帕明) 的表现渗透值。

实验部分

化学药品

本研究采用购自西格玛奥德里奇公司 (印度班加罗尔) 的阿替洛尔、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、曲米帕明和地昔帕明; 购自 Lab-Scan 公司的 HPLC 级乙腈和甲醇; 以及购自 Fluka 公司的甲酸。

目标分析物的储备液和合适的稀释液采用甲醇配制, 以进行方法开发。

样品制备与 PAMPA 方案

采用正己烷为溶剂配制体积比为 5% 的十六烷溶液, 在过滤 (供体) 板 (Millipore 的渗透实验用多层筛过滤板) 每个微孔的滤膜上加入等份试样。将供体板干燥, 确保正己烷蒸发。

将测试化合物溶于 DMSO, 得到 10 mM 的终浓度, 然后用 10 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 稀释到 10 μ M, 使得 DMSO 终浓度为 5%。

将 300 μ L 含 5% DMSO 的 10 mM 磷酸盐缓冲液 (PH=7) 加入受体板每个微孔中。将另外的 300 μ L 含有测试化合物和 5% DMSO 的 10 mM 磷酸盐缓冲液 (PH=7) 加入供体板微孔中。将荧光指示剂萤黄加入测试化合物溶液, 用来追踪膜的完整性。

将供体板嵌入受体板, 然后在潮湿环境下室温孵育 5 小时。分析标准品采用测试化合物溶液配制。地昔帕明是一种渗透性已知的化合物, 将其加到每个微孔板上作为对照。采用甲醇作为终止液。

孵育期结束时, 将供体板从受体板取出, 并将样品合并, 使其含有四种分析物。采用液相色谱/串联质谱对测试化合物在供体孔、受体孔以及平衡孔中的浓度进行定量。

仪器设备

实验采用 Agilent 1200 系列快速分离液相色谱系统和 Agilent 6460 三重串联四极杆质谱仪; 该液相色谱系统包括真空脱气机、二元泵、具有温度控制功能的高效自动进样器以及柱温箱。质谱仪在应用安捷伦喷射流技术的电喷雾模式下运行。安捷伦 MassHunter Optimizer (B.02.00) 软件用于确认丰度最高的 MRM 离子对以及相关碎裂电压和碰撞能量。安捷伦 MassHunter 工作站 (B.02.00 版本) 用于数据采集, MassHunter 定量分析软件 (B.01.04 版本) 用于数据分析。

分析方法详细参数

液相色谱条件见表 1；质谱条件见表 2。本研究采用的 MRM 离子对见表 3。所有离子对所用的 50 ms 驻留时间可为所有峰提供足够多的数据点。

数据分析

已知浓度样品、原料池样品、接收池样品以及平衡样品加载到多层过滤 96 孔样品板。孵育后，所用标准样品以及实验样品重复进样五次，取峰面积平均值用于计算。以平均峰面积对相应浓度绘制标准曲线，采用 1/X 为权重因数；所获得标准曲线线性相关系数在 0.95-0.99 范围内。原料池样品、接收池样品以及平衡样品中的目标化合物浓度采用样品平均峰面积以及目标化合物标准曲线计算获得。

计算

各化合物的表现渗透值采用以下公式计算：

$$P_{app} = C \times -\ln \left(1 - \frac{[\text{接收池样品浓度}]}{[\text{平衡样品浓度}]} \right)$$

其中： $C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D + V_A) \times \text{面积} \times \text{时间}}$

这里的 V_D 和 V_A 分别为原料池和接收池体积；面积为膜面积乘以孔隙率；平衡药物浓度为测试药物在原料样品池和接收池总体积里面的浓度。本实验中样品原料池与接收池体积均为 0.3 mL，膜面积为 0.0715 cm²，渗透时间为 5 小时，表现渗透值采用对数形式报告。

参数	详细信息
流动相	A: 水 (含 0.1% 甲酸) B: 乙腈 (含 0.1% 甲酸)
流速	0.5 毫升/分钟
梯度条件	0 分钟 25% B 0.2 分钟 60% B 0.3 – 0.5 分钟 75% B 0.6 – 0.9 分钟 95% B 1.0 – 1.2 分钟 100% B 1.25 – 1.5 分钟 25% B
运行时间	1.5 分钟
平衡时间	1 分钟
进样体积	1 微升
进样针清洗	置于清洗口中，用甲醇与水的 1:1 混合液清洗 10 s
色谱柱	安捷伦 Zorbax Eclipse XDB – C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm 粒径 (部件号 927700-902)
柱温	50°C

表 1:
液相色谱条件

参数	详细信息
离子化模式	应用安捷伦喷射流技术的正离子电喷雾模式
干燥气温度	350°C
干燥气流速	10 升/分钟
雾化气体压力	20 帕斯卡
毛细管电压	2000 伏特
鞘气温度	400°C
鞘气流速	11 升/分钟
喷口电压	0 伏特
Q1 分辨率	单位分辨率
Q2 分辨率	单位分辨率

表 2:
串联质谱条件

化合物	实验式	前体离子	产物离子 定量, 定性离子	碎裂 电压 (V)	碰撞能量 (eV) 定量, 定性离子
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
地昔帕明	C ₁₈ H ₂₂ N ₂	267.19	72.1	95	11

表 3:
用于对分析物进行鉴定与分析的串联质谱参数

结果与讨论

快速高分离度色谱和高选择性质谱技术应用于混合样品中多目标分析物的分析。图 1 所示为样品接收池样品典型色谱图；样品为美托洛尔、拉贝洛尔、丙咪嗪和去甲替林混合样品。当 $\text{Log } P_{\text{app}} < -0.5$ 表示差的渗透性；当 $\text{Log } P_{\text{app}} > -0.5$ 表示扩散有着良好的渗透性[1]。表 4 中所列为所选化合物的表现渗透值对数形式，表明化合物有着极好的渗透性。

总结

采用 Agilent 1200 系列快速高分离度色谱/Agilent 6460 型三重串联四极杆质谱液/质联用系统分析平行人工膜渗透性测试实验样品。MassHunter Optimizer 软件用于确定化合物的有效质谱参数。我们分别测定属于 4 类的 10 种不同药物化合物的表现渗透值。

参考文献

1. [http://www.cypotex.com/userfiles/file/Cloe_Screen_PAMPA_Permeability\(1\).pdf](http://www.cypotex.com/userfiles/file/Cloe_Screen_PAMPA_Permeability(1).pdf), Cypotex, Cloe Screen PAMPA flyer

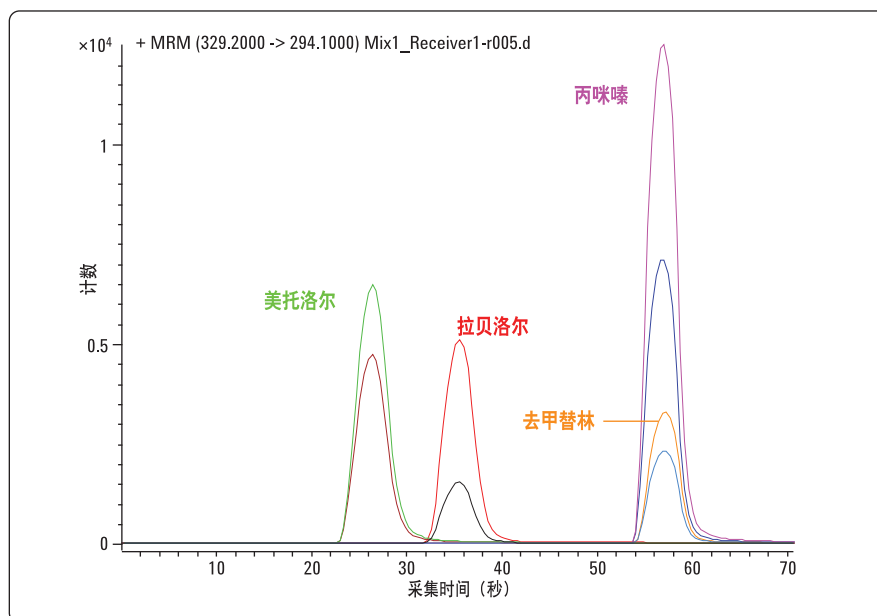


图 1:
样品接收池样品色谱图

化合物	Log P_{app}	标准偏差 (n=4)
阿替洛尔	-3.85	0.08
拉贝洛尔	-4.02	0.09
美托洛尔	-4.07	0.05
普萘洛尔	-4.08	0.07
丁螺环酮	-4.31	0.08
异搏定	-4.12	0.26
奈法唑酮	-4.23	0.16
去甲替林	-4.24	0.18
丙咪嗪	-4.24	0.15
曲米帕明	-4.20	0.15
地昔帕明	-4.18	0.16

表 4:
表现 P 值的对数形式

www.agilent.com/chem/qqq:cn

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2009 年
2009 年 10 月 1 日, 中国印刷
5990-4878CHCN



Agilent Technologies