

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 和 LC-QQQ 分析人血清和血浆中的羟氯喹及其代谢物

作者

Anne-Laure Larroque
麦吉尔大学健康中心研究所转
化生物学中心 (CTB) 药物发现
平台

Amichai Grunbaum
麦吉尔大学健康中心

Limian Zhao 和
Christophe Deckers
安捷伦科技有限公司

摘要

本研究开发并验证了一种可靠、灵敏的特异性方法，用于定量分析人血清和血浆中羟氯喹 (HCQ) 及其三种代谢物。首先对人血清或血浆样品 (100 μ L) 进行蛋白沉淀和 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化处理，然后进行 LC/MS/MS 分析。对于所有四种分析物，该分析方法的线性动态范围为 0.4–100 ng/mL，相关系数 $R^2 > 0.99$ 。使用 3 种加标浓度的 QC 样品 (1 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL) 验证方法的定量分析性能。结果表明，人血清和血浆的准确度在 100% \pm 15% 范围内，精密度 CV < 15%。该方法为定量人血液基质中的 HCQ 及其代谢物提供了可靠的解决方案。

前言

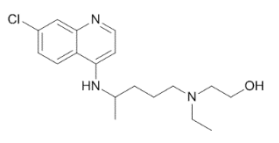
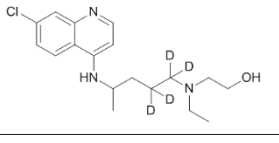
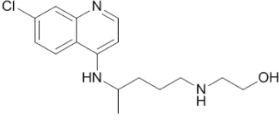
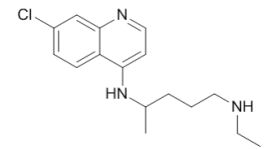
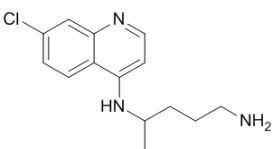
羟氯喹 (HCQ) 是抗疟药氯喹的羟基化形式。研究发现，其与氯喹具有同样的效果，且毒性更小^[1]，因此成为了预防和治疗疟疾及其他疾病最广泛使用的处方药之一。HCQ 通常口服给药，并在肝脏中代谢为三种活性代谢物：去乙基氯喹 (DCQ)、去乙基羟氯喹 (DHCQ) 和双去乙基氯喹 (BDCQ)。

大多数用于 HCQ 及其代谢物的分析方法都是基于高效液相色谱 (HPLC) 和荧光 (FL) 检测。然而，这些分析方法通常是非选择性的，而且需要大量样品。LC/MS/MS 已成为生物分析的首选检测方法，与传统 HPLC-FL 检测相比，其具有更高的灵敏度和选择性^[2-4]。这些分析方法常用的样品前处理技术包括简单的蛋白沉淀 (PPT) 或液液萃取 (LLE)。然而，这些样品前处理技术既耗时又费力，并且可能导致更复杂的基质干扰，在 LC/MS/MS 中引起离子抑制。

Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱和 96 孔板采用新型 EMR-Lipid 吸附剂，能够选择性去除生物样品基质中的主要脂类。其机理是基于脂质化合物和 EMR-Lipid 吸附剂之间的体积排阻和疏水相互作用，因此不会造成分析物意外损失。经过常见的蛋白质沉淀处理后进行 Captiva EMR-Lipid 净化，能够高效且选择性地去除血液基质中的蛋白质和磷脂。之前的研究证明，Captiva EMR 净化可以去除生物血液基质中 99% 以上的磷脂^[5]。Captiva EMR-Lipid 96 孔板可通过简化的孔内 PPT 和直通净

化实现高效、高通量的样品前处理。无需多次样品转移，节省了时间和精力，减少了操作失误和潜在的分析物损失。该方法已在多个临床研究应用的生物血液样品分析中得到验证^[6,7]，包括人全血中 HCQ 及其代谢物的定量^[8]。本研究将该方法的应用范围扩展到了人血浆和血清，以完善不同的人血液基质中 HCQ 及其代谢物的定量分析。表 1 列出了 4 种目标分析物 (HCQ、DCQ、DHCQ 和 BDCQ) 和内标 HCQ-d₄ 的信息。

表 1. 目标分子

分子	结构	化学式	[M+H] ⁺ (m/z)	pKa
羟氯喹 (HCQ)		C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O	336.1837	8.3 和 9.7 [9a]
羟氯喹-d ₄ (HCQ-d ₄)		C ₁₈ H ₂₂ D ₄ ClN ₃ O	340.2088	不适用
去乙基羟氯喹 (DHCQ)		C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	308.1524	10 和 15.6 [9b]
去乙基氯喹 (DCQ)		C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃	292.1575	8.4 和 10.9 [9a]
双去乙基氯喹 (BDCQ)		C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃	264.1262	10.2 [9b]

实验部分

试剂与化学品

所有试剂和溶剂均为 LC/MS 级。OmniSolv 乙腈 (ACN)、甲醇 (MeOH) 和 LiChropur 甲酸 (FA) 购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。试剂级氢氧化铵 (NH₄OH) 购自 Ward's Science (Rochester, NY, USA)。分析物标准品和内标 (IS) 购自 Toronto Research Chemical (North York, ON, Canada)。人血清和血浆 K₂EDTA 购自 BioIVT (Westbury, NY, USA)。

标样和溶液

用水配制 1 mg/mL HCQ 和内标 (HCQ-d₄) 的单标储备液。用甲醇 (MeOH) 配制 1 mg/mL BDCQ、DHCQ 和 DCQ 的单标储备液。所有储备液和工作溶液均在 -20 °C 下保存。使用 MeOH:水 (1:1, v:v) 配制中间稀释液。

用水配制 10 µg/mL 的四种分析物标样加标溶液。用水配制 1 µg/mL 的 IS 加标溶液，并将其直接加入样品中。

将 1 mL FA 加入 1 L Milli-Q 水中，制得流动相 A (含 0.1% FA 的水)。将 1 mL FA 加入 1 L ACN 中，制得流动相 B (含 0.1% FA 的 ACN)。将 190 mL ACN 与 10 mL MeOH 混合，制得沉淀溶剂 (95/5 ACN/MeOH)。将其于 -20 °C 保存。将 160 mL ACN 和 40 mL Milli-Q 水混合，然后加入 50 mL 浓 NH₄OH (29% 氨水溶液)，得到洗脱溶剂 (80/20 ACN/水，含 5.8% NH₄OH)。将 95 mL ACN、5 mL 水和 100 µL FA 混合，制得复溶液 (95/5 ACN/水，含 0.1% FA)。所有试剂均在室温下保存和使用。

样品前处理设备和消耗品

- Agilent Captiva EMR-Lipid, 96 孔板, 40 mg (部件号 5190-1000)
- 安捷伦正压 96 孔处理装置 (PPM-96) (部件号 5191-4116)
- 安捷伦方形 96 孔 2 mL 收集板 (部件号 5133009)

- 安捷伦方形 96 孔密封盖 (部件号 5133005)
- 涡旋仪, VWR
- 振荡器, 赛默飞世尔科技
- 蒸发器, CentriVap Complete, Labconco
- 5424 R 离心机, Eppendorf
- 移液器

仪器方法

样品在 LC-QQQ 系统上的运行条件如下:

HPLC 条件			
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8, 2.1 × 50 mm, 3.5 µm (部件号 971700-906)		
流速	0.3 mL/min		
柱温	40 °C		
进样量	10 µL		
流动相	A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 0.1% 甲酸乙腈溶液		
梯度	时间 (min)	%B	流速 (mL/min)
	0	5	0.3
	1.0	5	0.3
	2.0	8	0.3
	5.0	10	0.3
	5.1	70	0.3
	7.0	70	0.3
后运行时间	3.0 min		
QQQ 条件			
气体温度	350 °C		
气体流速	7 L/min		
雾化器	35 psi		
鞘气温度	350 °C		
鞘气流速	11 L/min		
毛细管	3500 V (正离子)		
数据采集	MRM 如表 2 所示		

表 2. 目标分析物 MRM 条件

分析物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE (V)	RT (min)
HCQ	336.2	247.0	19	3.17
		158.2	19	
HCQ-d ₄ (IS)	340.2	251.0	19	3.16
		162.2	19	
BDCQ	264.1	179.0	20	2.55
		247.0	15	
DHCQ	308.1	179.0	20	2.70
		130.2	17	
DCQ	292.2	179.0	18	3.10
		114.3	16	

校准标样和质量控制 (QC) 样品前处理

校准曲线的动态范围为 0.4–100 ng/mL, 包括 0.4、1、5、10、50、80、100 ng/mL。将适当体积的标样加标溶液加入血浆或血清空白中, 然后涡旋混合, 制得上述标样。运行三个浓度的 QC 样品进行方法验证测试, 包括 1 ng/mL 的低浓度 QC 样品、10 ng/mL 的中等浓度 QC 样品以及 100 ng/mL 的高浓度 QC 样品。将适当体积的加标溶液加入基质空白中, 制得上述 QC 样品。然后将适量 IS 加标溶液加入校准标样和 QC 样品中, 以获得基质中 50 ng/mL 的最终 IS 浓度。轻轻涡旋混合所有样品, 完成样品前处理过程。使用 10 ng/mL 和 100 ng/mL 的相应纯标准溶液复溶干燥的基质空白残渣, 制得基质匹配的 QC 样品。用复溶溶液适当稀释标样加标溶液至 10 和 100 ng/mL, 制得纯标准溶液。

样品前处理

样品前处理流程如图 1 所示。方法步骤与人全血样品的前处理方法基本相同^[8], 不同之处在于将 IS 加标至血清和血浆样品中后不需要再用水稀释。将水加入全血样品中, 可以通过渗透分解来裂解红细胞, 以释放潜在附着到红细胞中的任何分析物。然而, 血清或血浆的前处理不需要此步骤。

方法验证

通过准确度和精度 (A&P) 运行对开发的方法进行验证。配制两组校准标样、QC 样品在三个浓度下的 6 个平行样品和基质空白。在序列开始和结束时运行两组校准标样, 在序列中将三个浓度的 QC 样品按从低至高的顺序进样分析。运行基质空白样品进行方法选择性和交叉污染评估。

分析物绝对回收率和基质效应

根据预加标 QC 和基质匹配的 QC 在中等浓度 (10 ng/mL) 和高浓度 (100 ng/mL) 下的分析物峰面积比较, 对分析物绝对回收率进行评估。根据基质匹配的 QC 和纯标准品在 10 和 100 ng/mL 等效浓度下的分析物峰面积比较进行基质评估。

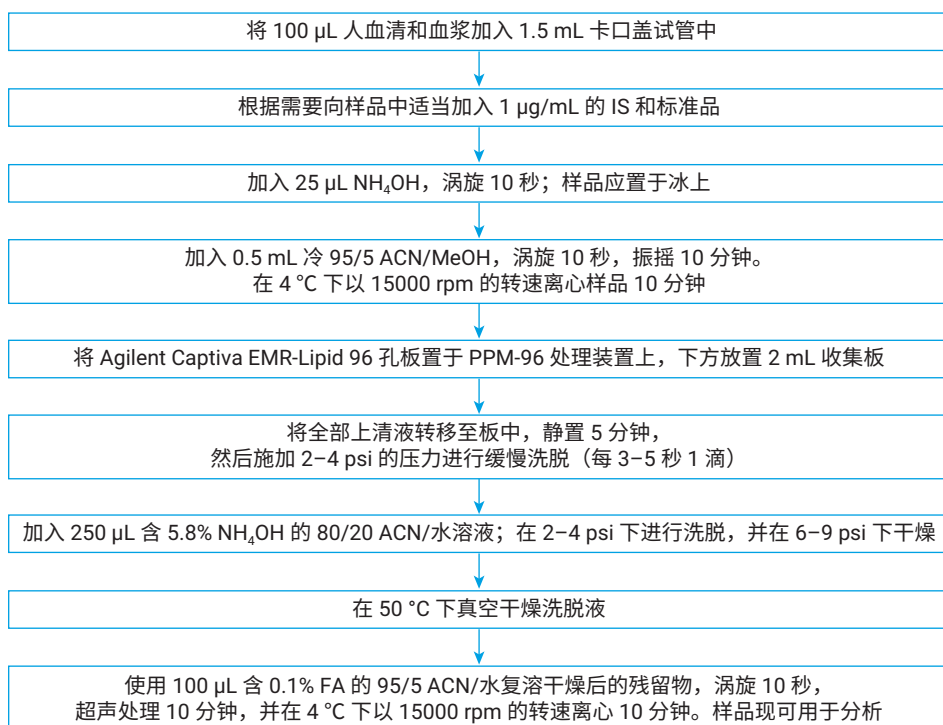


图 1. 样品前处理流程

结果与讨论

样品前处理方法

使用有机沉淀溶剂（如 ACN 或 MeOH）的蛋白质沉淀法被用于提取生物血液基质中的 HCQ 及其代谢物^[10]。碱性药物使用含 1% 氢氧化铵 (NH₄OH) 的碱性沉淀溶剂^[11]。由于 HCQ 及其代谢物是碱性化合物，使用氢氧化铵增加基质 pH 值可以提高提取率（表 1）。在血液基质的生理 pH 下，HCQ 及其代谢物主要为双阳离子形式。据报道，含 5.8% NH₄OH (v:v) 的沉淀溶剂能够完全中和基质中的目标分析物，从而提高提取率^[12]。在三种血液基质中测试不同的沉淀溶剂/溶剂混合物，结果表明含 5.8% NH₄OH 的 95/5 ACN/MeOH 混合物为蛋白质沉淀提取的最佳沉淀溶剂。此外，在洗脱后使用含 5.8% NH₄OH 的 80/20 ACN/水溶液进行清洗可以提高回收率。

分析物回收率和基质效应

分析物回收率评估结果如图 2 所示。在人血浆和血清基质中，所有目标物的绝对回收率均在 60%–120% 范围内，RSD < 15%。低浓度和高浓度下的分析物回收率较为一致，表明在不同浓度下此样品前处理方法可以提供一致的提取效率。

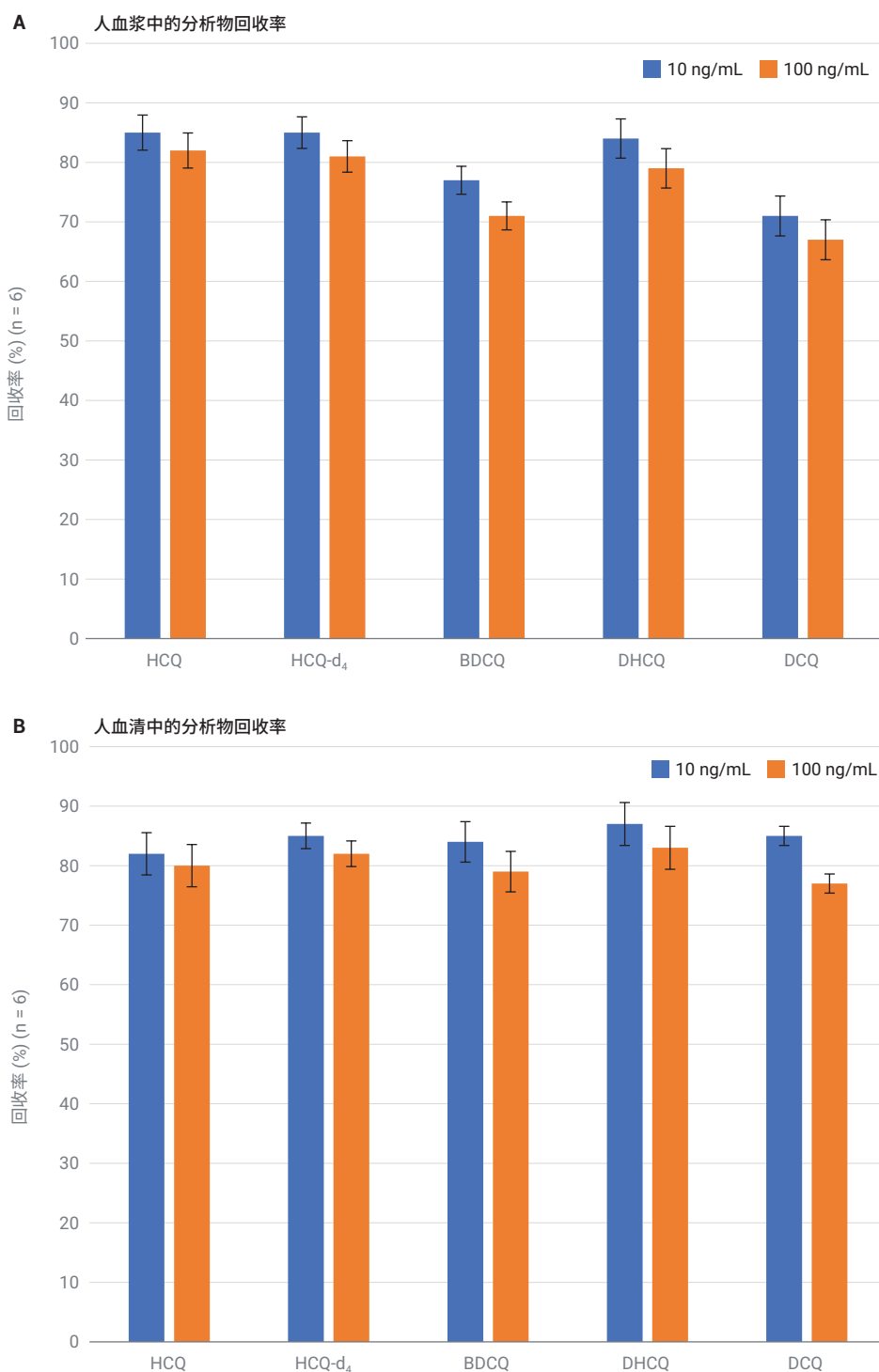


图 2. 人血浆 (A) 和人血清 (B) 中浓度为 10 ng/mL 和 100 ng/mL 的分析物回收率

分析物基质效应评估结果如图 3 所示。在人血浆和血清基质中，所有目标物的基质效应均 > 50%（低浓度 DCQ 除外）。一般情况下，低浓度样品在血浆和血清中基质效应都较低，说明基质对低浓度样品的影响较大。虽然基质效应是评估分析方法的一个很好的参数，但只要定量方法可靠，就不存在具体的可接受标准。

方法灵敏度和选择性

作为方法验证的一部分，根据 LOQ 浓度下的信噪比 (S/N) 评估了方法灵敏度，并在 LOQ 浓度下比较基质空白对相应分析物峰面积的贡献评估了方法选择性。图 4 和图 5 展示了人血清和血浆中每种分析物的基质空白和定量限 (LOQ) 的色谱图。在 0.4 ng/mL LOQ 下，分析物的 S/N ≥ 10 。在 LOQ 浓度下，基质空白的贡献低于分析物响应的 20%。结果表明方法的灵敏度高、选择性好，证明了此定量方法的可靠性。

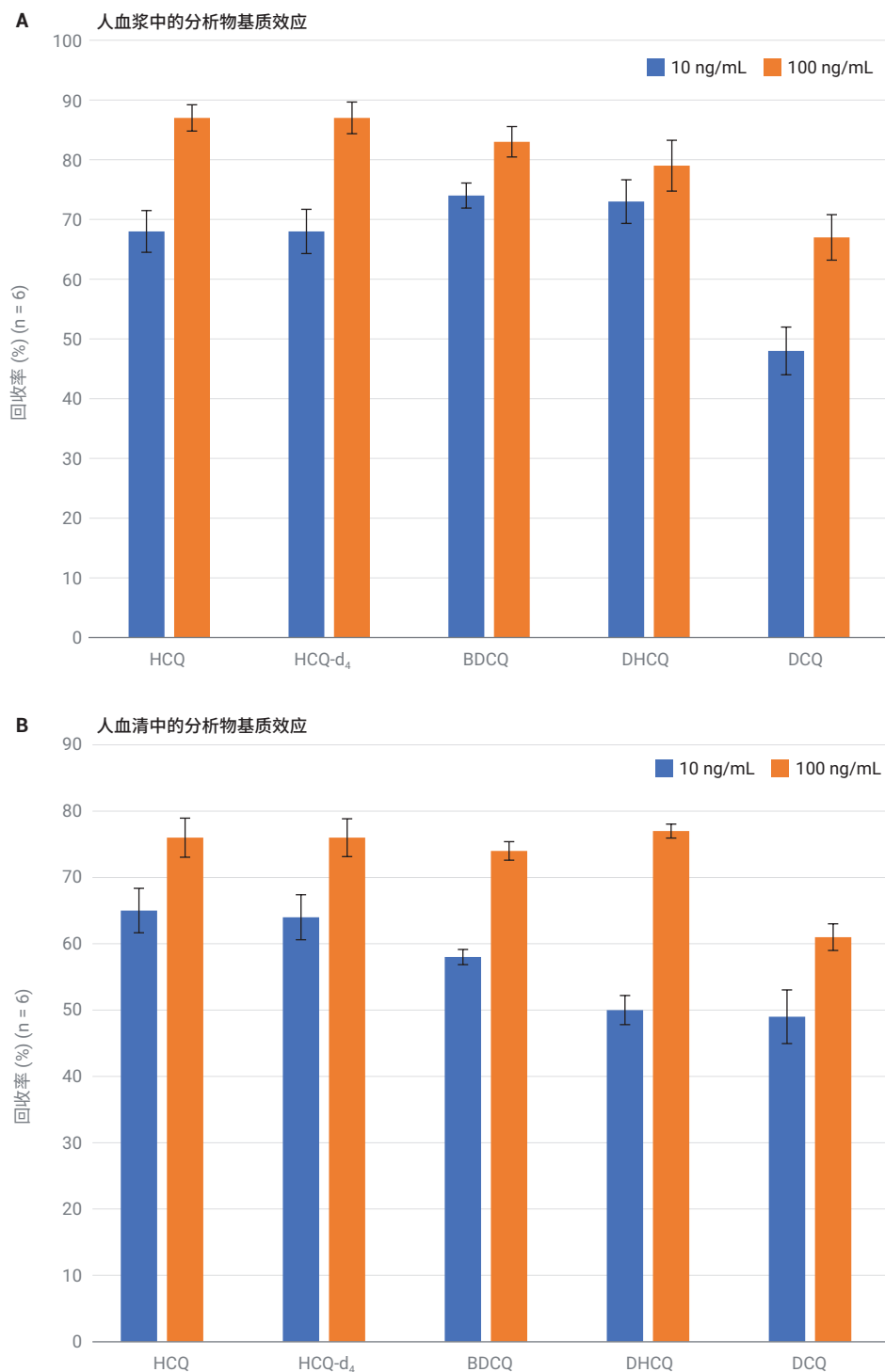


图 3. 人血浆 (A) 和人血清 (B) 中浓度为 10 ng/mL 和 100 ng/mL 的分析物基质效应

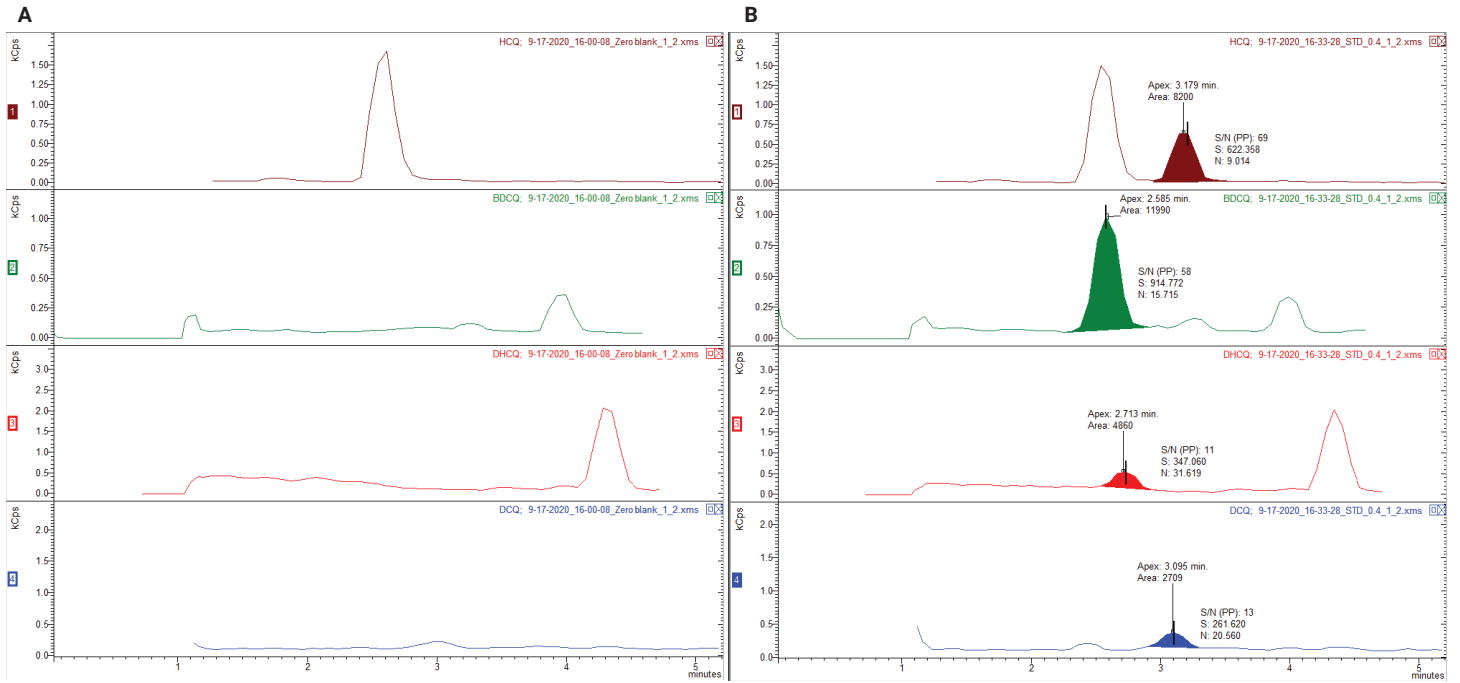


图 4. 4 种目标分析物的人血清基质空白 (A) 和 LOQ (B) 的 LC/MS/MS MRM 色谱图

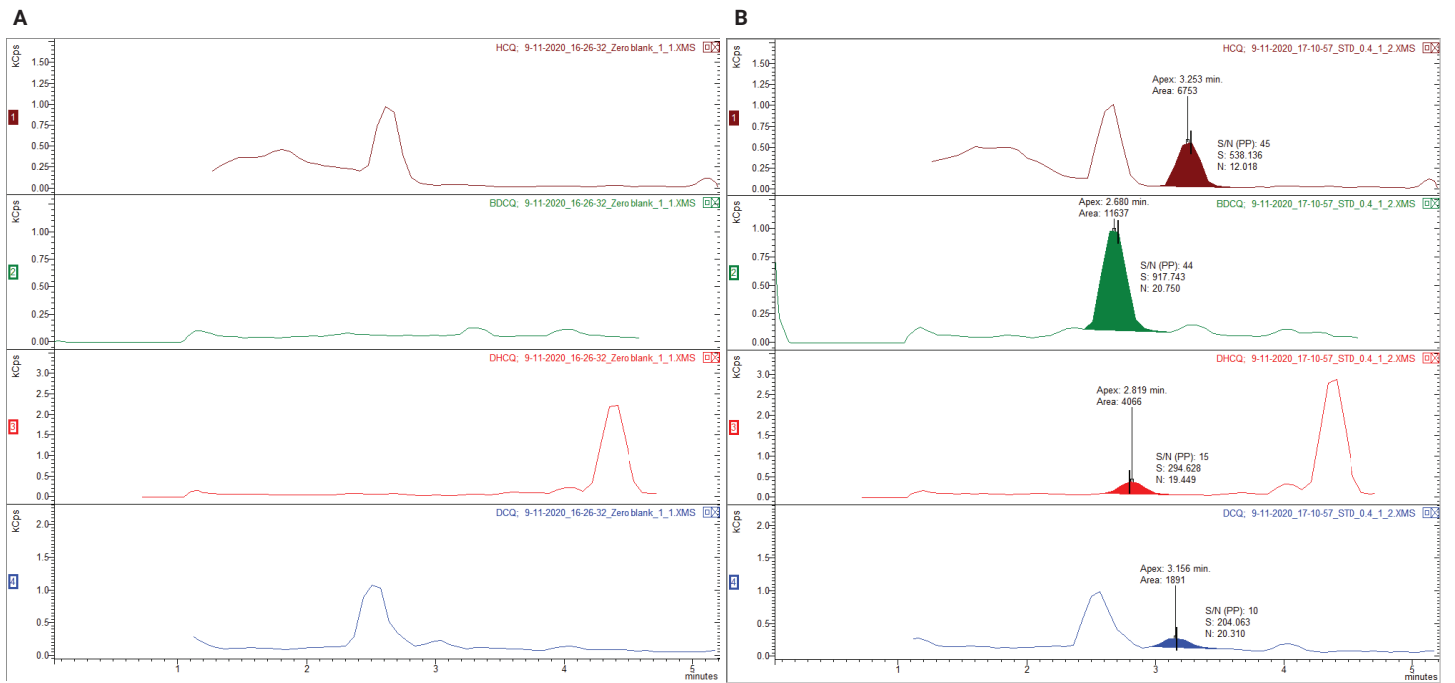


图 5. 4 种目标分析物的人血浆基质空白 (A) 和 LOQ (B) 的 LC/MS/MS MRM 色谱图

校准曲线线性

在基质中 0.4–100 ng/mL 的动态范围内证明了方法的线性。校准曲线采用线性

回归拟合和 $1/x$ 的权重。人血浆中各分析物的校准曲线如图 6 所示，人血清中相应的校准曲线如图 7 所示。在校准范

围内，所有曲线均表现出优异的线性， $R^2 > 0.99$ 。

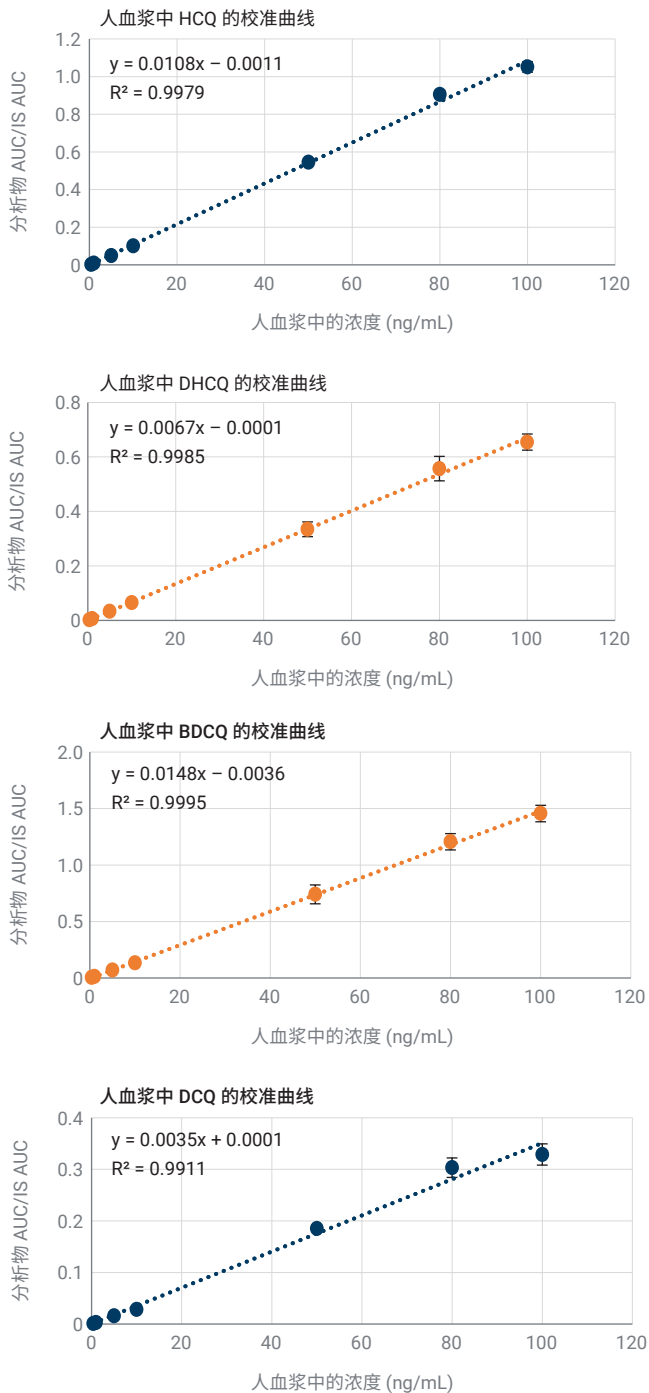


图 6. 人血浆中 4 种目标分析物在 0.4–100 ng/mL 范围内的校准曲线

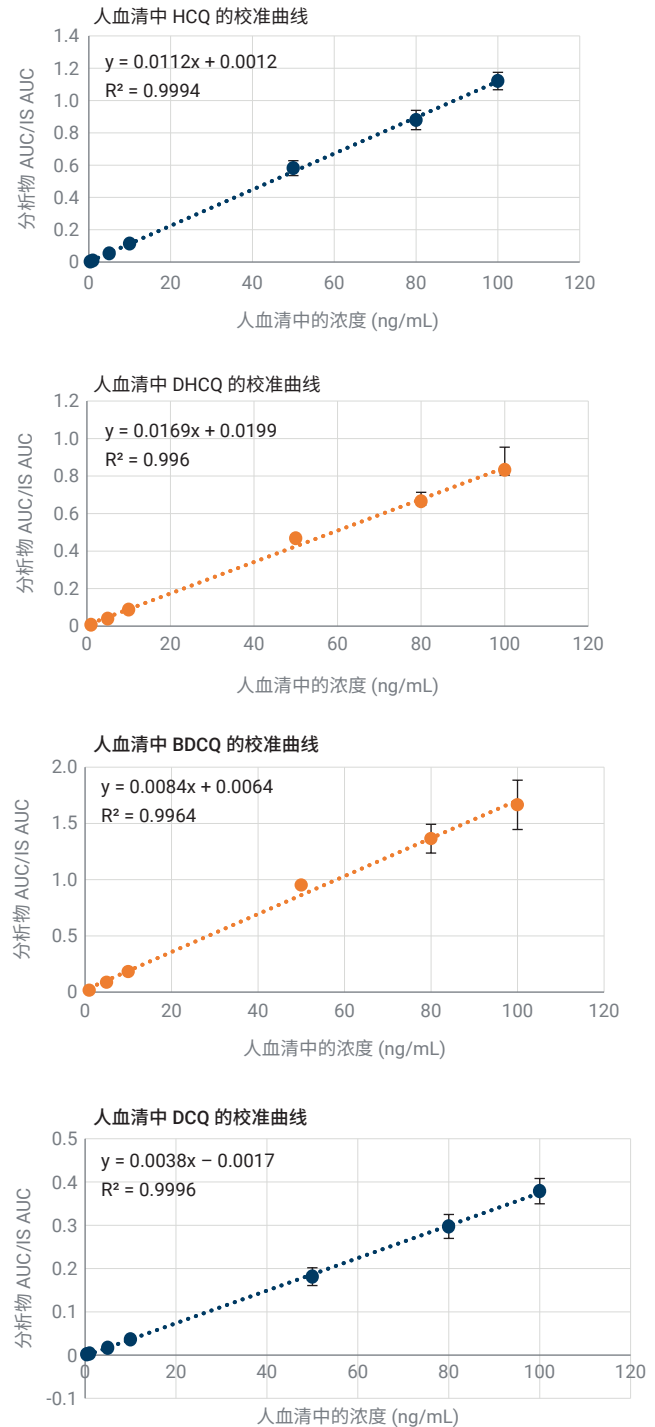


图 7. 人血清中 4 种目标分析物在 0.4–100 ng/mL 范围内的校准曲线

定量准确度和精度

通过准确度和精度 (A&P) 运行收集完整的定量结果，对开发的方法进行验证。结果如图 3 所示，包括 2 种基质中 3 个浓度下所有分析物的准确度和 CV。A&P 运行的定量结果表明获得了优异的方法准确度和精度，满足临床研究检测的典型可接受标准（准确度为 $100 \pm 15\%$ ，且 $CV \leq 15\%$ ）。

结论

建立了一种稳定的方法，使用蛋白质沉淀和 Captiva EMR-Lipid 净化，并通过 LC-QQQ 快速可靠地分析人血清和血浆中的羟氯喹及其代谢物。此方法可提供出色的分析物定量结果，具有优异的准确度和精度、校准曲线线性、灵敏度和选择性、高效回收率以及基质去除，同时简化了工作流程。

表 3. 人血清和血浆中 HCQ 及其三种代谢物的方法准确度和精度结果

样品基质	加标浓度	HCQ	DHCQ	DCQ	BDCQ	
人血浆	1 ng/mL (n = 6)	计算浓度 (ng/mL)	1.06	1.09	1.09	1.09
		准确度 %	106	109	109	109
		CV %	1.9	4.1	2.5	7.3
	10 ng/mL (n = 6)	计算浓度 (ng/mL)	10.27	10.48	10.90	10.50
		准确度 %	103	105	109	105
		CV %	3.6	2.3	6.5	5.0
	100 ng/mL (n = 6)	计算浓度 (ng/mL)	105.64	104.70	111.93	109.95
		准确度 %	106	105	112	110
		CV %	2.1	5.6	5.0	6.3
人血清	1 ng/mL (n = 6)	计算浓度 (ng/mL)	1.04	1.15	1.00	1.15
		准确度 %	104	115	100	115
		CV %	3.5	5.5	12.6	3.1
	10 ng/mL (n = 6)	计算浓度 (ng/mL)	10.39	11.51	11.28	11.52
		准确度 %	104	115	113	115
		CV %	4.2	2.5	5.4	3.5
	100 ng/mL (n = 6)	计算浓度 (ng/mL)	102.56	103.31	114.82	98.47
		准确度 %	103	103	115	98
		CV %	1.7	4.2	2.7	5.4

参考文献

1. Lim, H. S. et al. Pharmacokinetics of Hydroxychloroquine and its Clinical Implications in Chemoprophylaxis Against Malaria Caused by Plasmodium Vivax, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 1468-1475
2. Wang, L-Z.; Ong, R. Y-L.; Chin, T-M.; Thuya, W-L.; Goh, B-C. Method Development and Validation for Rapid Quantification of Hydroxychloroquine in Human Blood Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, 61, 86–92
3. Füzéry, A. K.; Breaud, A. R.; Emezienna, N.; Schools, S.; Clarke, W. A. A Rapid and Reliable Method for the Quantitation of Hydroxychloroquine in Serum Using Turbulent Flow Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clinica Chim. Acta* **2013**, 421, 79-84
4. Soichot, M.; Mégarbane, B.; Houzé, P.; Chevillard, L.; Bourgogne, E. Development, Validation and Clinical Application of a LC-MS/MS Method for the Simultaneous Quantification of Hydroxychloroquine and Its Active Metabolites in Human Whole Blood. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, 100, 131–137
5. Zhao, L.; Juck, M. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 96 孔板进行生物体液样品的蛋白质沉淀, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-9222ZHCN, **2018**
6. Zhao, L.; Lucas, D. 使用 Agilent EMR-Lipid 净化产品对人血清中的药物进行 LC/MS/MS 定量分析, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-8007CHCN, **2017**
7. Lucas, D.; Zhao, L. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 分析生物样品中的维生素 D 代谢物, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-7956CHCN, **2017**
8. Larroque, A-L.; Grunbaum, A.; Zhao, L.; Deckers, C. Analysis of Hydroxychloroquine and Metabolites in Human Whole Blood Using the Agilent Captiva EMR—Lipid by LC/TQ (使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 和 LC/TQ 分析人全血中的羟氯喹及其代谢物), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-2420EN, **2020**
9. A) Warhurst, D. C.; Steele, J. C. P.; Adagu, I. S.; Craig, J. C.; Cullander, C. Hydroxychloroquine is Much Less Active Than Chloroquine Against Chloroquine-Resistant Plasmodium Falciparum, in Agreement with its Physicochemical Properties, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2003**, 52(2), 188–193.
B) DHCQ 和 BDCQ 的预测值, <https://go.drugbank.com/metabolites/DBMET02740>, <https://go.drugbank.com/metabolites/DBMET02741>
10. Chhonker, Y. S.; Sleightholm, R. L.; Li, J.; Oupický, Murry, D. J. Simultaneous Quantitation of Hydroxychloroquine and its Metabolites in Mouse Blood and Tissues Using LC-ESI-MS/MS: an Application for Pharmacokinetic Studies, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, 1072, 320–327
11. Zhao, L. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化产品对人全血中的滥用药物进行 LC/MS/MS 定量测定, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-9251ZHCN, **2018**
12. Charlier, B.; Pingeon, M.; Piaz, F. D.; Conti, V.; Valentini, G.; Filippelli, A.; Izzo, V. Development of a Novel Ion-Pairing HPLC-FL Method for the Separation and Quantification of Hydroxychloroquine and its Metabolites in Whole Blood, *Biomed. Chromatogr.* **2018** Aug, 32(8), e4258

致谢

衷心感谢 Nathalie Bourgeois 发起的这项合作, 以及 Jean-Claude 博士、Das 博士和 Kremer 博士的支持。

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

RA 44200.5218865741

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2021
2021 年 1 月 26 日, 中国出版
5994-2949ZHCN

