

应用 Agilent Ultivo LC/TQ 对血浆中的褪黑素进行快速的常规定量研究



图 1. 配备标准 ESI 离子源的 Ultivo LC/TQ

作者

Mark Sartain
安捷伦科技有限公司，
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱与配备 ESI 离子源的 Agilent Ultivo 三重四极杆 LC/MS 联用系统对褪黑素 (MEL) 进行的定量研究。对于加标至血浆中的褪黑素-D4 (MEL-D4)，经优化的 LC/MS 方法获得了 10 pg/mL 的定量下限 (LLOQ)。这种高灵敏度的快速研究方法可以定量分析通过简单的蛋白质沉淀方法前处理的复杂人血浆提取物中的低浓度内源性 MEL。

前言

MEL 是一种内源性激素和强效的神经递质，帮助调节生理节律和睡眠，通常用于治疗失眠等睡眠障碍。有关药代动力学和内源性 MEL 产生的研究需要能够测量低分布浓度的 MEL 的分析技术，该浓度随个体和一天中时间的变化而变化。由于 LC/MS/MS 方法比传统的放射免疫分析具有更高的特异性，该方法已经得到广泛应用，目前已经开发了 LC/MS/MS 方法以满足对血浆中 MEL 进行高灵敏度和高特异性定量的生物分析要求。

本应用简报表明 1260 Infinity II Prime 液相色谱与配备 ESI 离子源的 Ultivo LC/TQ 的联用系统可获得精确定量人血浆中的 MEL 所需的分析灵敏度。

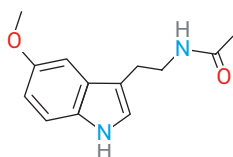


图 2. 褪黑素

实验部分

试剂与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。乙腈和甲醇购自 Honeywell (Morristown, NJ, USA)。超纯水产自配备 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 系统 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。LC/MS 级甲酸购自 Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)。氟化铵和 LC/MS 级甲酸铵购自 Millipore Sigma (St. Louis, MO, USA)。MEL ($\geq 98\%$) 和 MEL-D4 ($\geq 98\%$ MEL, $\geq 99\%$ 氘代形式 D1-D4) 购自 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)。NIST SRM 1950 人血浆购自 Millipore Sigma。柠檬酸盐人血浆也购自 Millipore Sigma，仅用于回收率研究。

对于血浆中 MEL-D4 的 LLOQ 测定，采用血浆提取物配制 13 个校准浓度，浓度范围为 10 pg/mL 至 100 ng/mL。根据制造商对氘代 MEL (D1-D4) 的建议，首先通过与标准曲线相关的定量离子对 (237.1 \rightarrow 178.1 与 233.1 \rightarrow 174.1) 峰强度比，根据精确量的未标记 MEL 对此标准储备混合液进行定量。我们并未在 MEL-D4 中观察到大量的 D0 形式。在纯溶剂中分析 100 ng/mL MEL-D4 时没有明显的未标记 MEL MRM 信号 ($< 0.1\%$) 可以证明这一点。

样品前处理

对于所有实验，血浆的蛋白质沉淀步骤如下：将 EDTA (0.5 mol/L, 50 μL) 加入到 200 μL 于冰上保存的血浆等分试样中，短暂涡旋混合。加入乙腈 (750 μL)，涡旋 30 秒，在冰上孵育 20 分钟，然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 16000 $\times g$ 的速度离心 10 分钟以沉淀蛋白质。将有机上清液 (800 μL) 转移至 2 mL 棕色 LC/MS 样品瓶中，利用真空浓缩仪对其进行干燥。将提取物复溶于 100 μL 甲醇，超声水浴处理 5 分钟，然后转移至 250 μL 玻璃自动进样器样品瓶内插管中，用于 LC/MS 分析。此外，需使用重组血浆配制校准曲线样品。MEL 是一种光敏化合物，注意尽量减少光照。

对于回收率评估，在提取之前 (预加标)，向四个血浆重复试样中加标 MT-D4，加标浓度为 1 ng/mL。将上述重复试样与后加标的四个血浆重复试样进行比较，计算回收率。

为了测定内源性 MEL，向一份血浆等分试样中预加标 MT-D4，加标浓度为 10 ng/mL，以校正样品前处理中的损失，实现准确定量。

仪器

Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱仪：

- Agilent 1260 Infinity II Prime 全能泵 (G7104C)
- Agilent 1260 Infinity II Multisampler, 配备冷却装置 (G7167A)
- Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A)
- Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统
- 安捷伦电喷雾离子源 (G1948B)

方法

LC/MS 条件和参数如下表所示。

软件

Ultivo 1.1 Agilent MassHunter LC/MS 数据采集软件，包括 MassHunter Optimizer 和 MassHunter Source Optimizer 软件，用于操作 Ultivo-ESI LC/MS 系统并优化参数。使用具有 Quant-My-Way 功能的 Agilent MassHunter 定量分析软件（版本 B.09）对 MRM 数据进行定量。

结果与讨论

方法优化

使用 MassHunter Optimizer 软件优化 MEL 和 MEL-D4 的 MRM 离子对（表 1）。

1260 Infinity II Prime 液相色谱系统																						
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 μm (部件号 699675-902)																					
柱温	35 °C																					
进样量	3 μL, 采用叠加进样程序																					
自动进样器温度	4 °C																					
进样针清洗	冲洗口 10 秒 (50:50 甲醇/H ₂ O)																					
流动相	A) 5 mmol/L 甲酸铵, 0.2 mmol/L 氟化铵, 0.1% 甲酸水溶液 B) 5 mmol/L 甲酸铵, 0.2 mmol/L 氟化铵, 0.1% 甲酸的甲醇溶液																					
流速	400 μL/min																					
梯度程序	<table border="1"><thead><tr><th>时间</th><th>%A</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>3.00</td><td>55</td><td>45</td></tr><tr><td>3.10</td><td>2</td><td>98</td></tr><tr><td>4.10</td><td>2</td><td>98</td></tr><tr><td>4.20</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>6.50</td><td>95</td><td>5</td></tr></tbody></table>	时间	%A	%B	0.00	95	5	3.00	55	45	3.10	2	98	4.10	2	98	4.20	95	5	6.50	95	5
时间	%A	%B																				
0.00	95	5																				
3.00	55	45																				
3.10	2	98																				
4.10	2	98																				
4.20	95	5																				
6.50	95	5																				
停止时间	6.5 min																					
观察到的压力范围	350–570 bar																					

Ultivo 三重四极杆液质联用系统	
离子源	ESI
极性	正离子
气体温度	350 °C
气体流速	13 L/min
雾化器压力	60 psi
毛细管电压	2000 V (+)
扫描类型	MRM
Q1/Q2 分辨率	单位 (0.7 amu)
循环时间	564 ms
MRM 总数	4
每个 MRM 的驻留时间	140 ms

表 1. 优化的 MRM 离子对参数

化合物	类型	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碎裂电压 (V)	CE (V)
MEL	定量离子	233.1	174.1	87	12
MEL	定性离子	233.1	159.0	87	32
MEL-D4	定量离子	237.2	178.1	87	12
MEL-D4	定性离子	237.2	163.1	87	32

将经优化的 MEL 碎裂和碰撞能量 (CE) 电压与之前使用 MassHunter Optimizer 软件和 Agilent 6470 三重四极杆 LC/MS 获得的值进行比较 (图 3)。在上述两种情况下, 选择相同的两种强度最高的子离子 (m/z 174 和 159), 结果显示十分相似的离子碎裂曲线和优化参数。这是一个典型示例, 表明 MRM 方法可以可靠地在不同安捷伦 LC/TQ 仪器之间进行转移。

方法灵敏度、精密度和线性

由于血浆中存在内源性 MEL, 将 MEL-D4 加标至血浆提取物中以测定 MEL 检测限 (LOD)、LLOQ 和定量上限 (ULOQ) (图 4)。LOD 定义为能与空白明显区分的最低浓度, 信噪比 (S/N) 大于 3。由于血浆样品浓缩了两倍, 还计算了血浆中的原始浓度。

参数	6470	Ultivo-ESI
碎裂电压 V	90	87
CE (233 → 174)	12	12
CE (233 → 159)	32	32

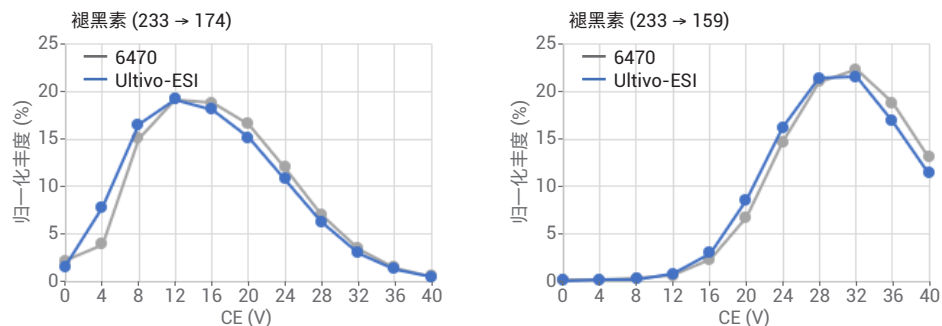


图 3. 6470 三重四极杆 LC/MS 和 Ultivo-ESI 的离子碎裂曲线和经优化的碎裂和 CE 电压的比较, 使用 MassHunter Optimizer 软件获得

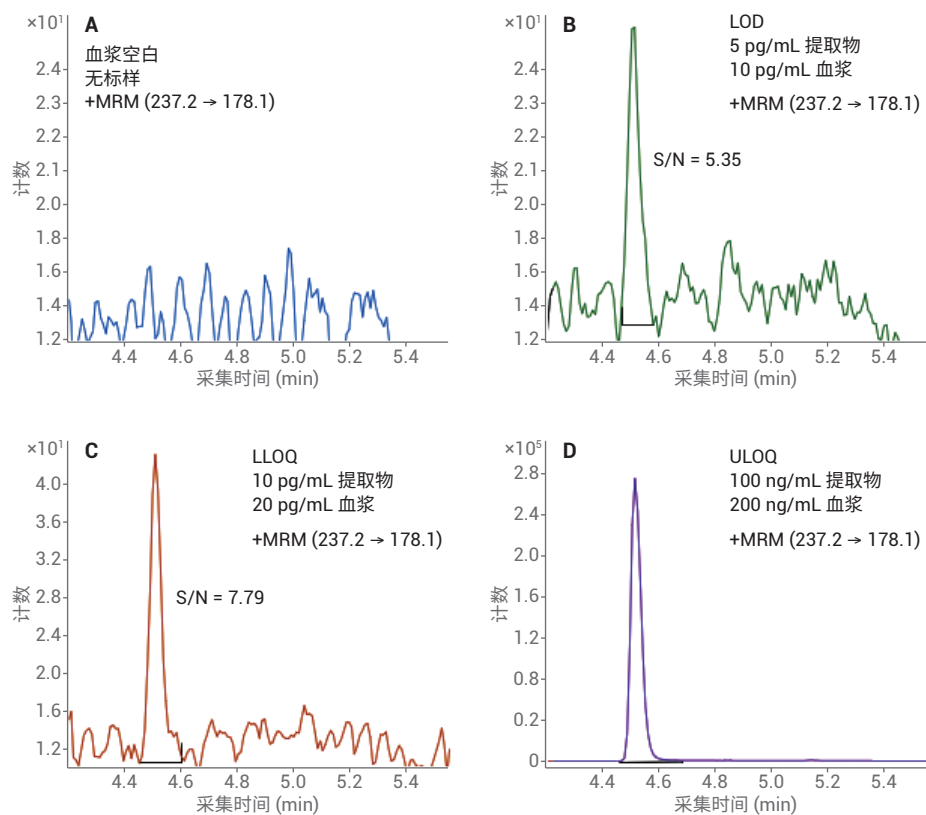


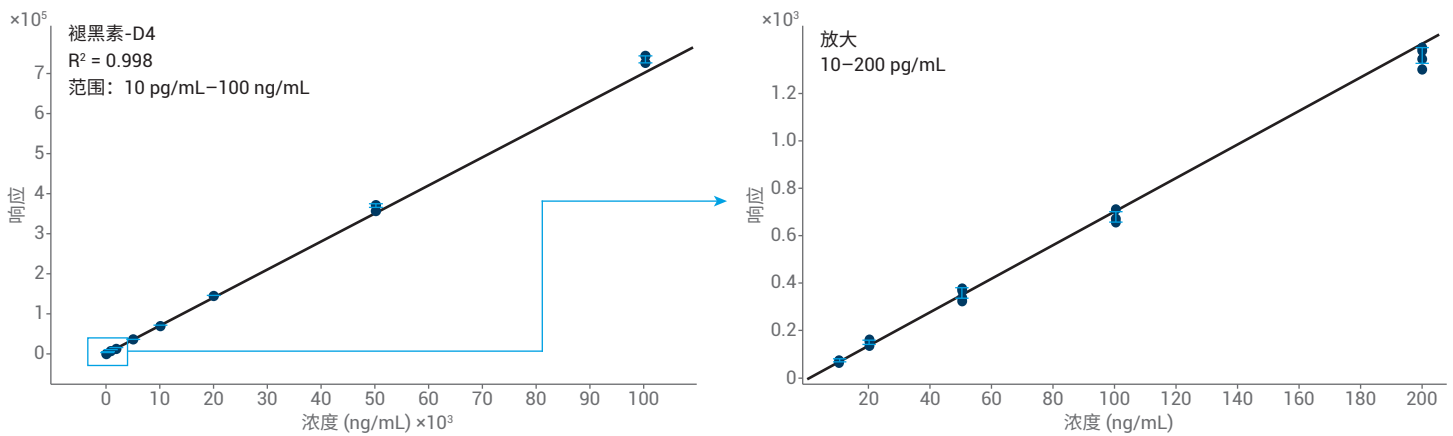
图 4. 加标至血浆提取物中的 MT-D4 的代表性定量离子 (m/z 237.2 → 178.1) MRM 色谱图

在 13 种浓度（范围从 LLOQ (10 pg/mL) 到 ULOQ (100 ng/mL)）下评估了测量的精密度和准确度，每种浓度进行六次重复进样。所有浓度下均获得了出色的分析精密度和平均准确度

(95%–105%)。校准曲线的相关系数 (R^2) 在四个数量级的动态范围内为 0.998 (图 5)。在 78 次进样中获得了优异的保留时间精密度和准确度 (RSD% = 0.07%)。

内源性 MEL 定量

本文评估了一种简单的蛋白质沉淀方法对于血浆中 MEL 的提取回收率。MEL-D4 作为 MEL 的替代物，用于计算回收率百分比。将 MEL-D4 以 1 ng/mL 的浓度对血浆进行预加标和后加标，每种加标制备四个重复样并进行评估。平均回收率为 95.0% ($\pm 6.0\%$, 1 SD)。



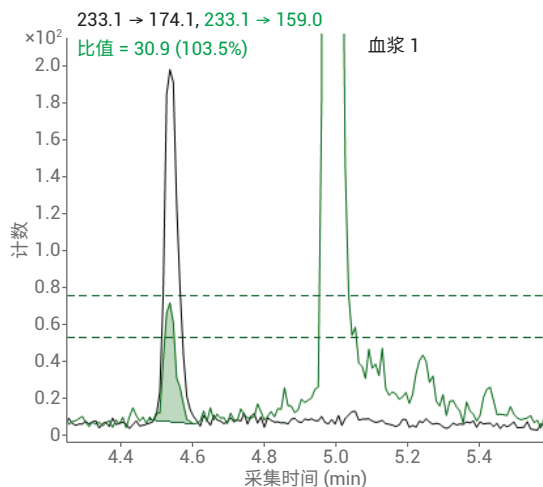
褪黑素-D4	浓度												
	10	20	50	100	200	500	1000	2000	5000	10000	20000	50000	100000
平均准确度 (% , n = 6)	99.5	102.3	100.0	95.6	96.2	96.9	99.1	99.0	99.6	99.9	102.7	104.8	104.3
重现性 (%RSD, n = 6)	6.5	7.2	5.8	3.0	2.4	1.4	1.1	1.1	0.7	0.6	0.9	1.5	1.2

图 5. 加标至血浆提取物中的 MEL-D4 的校准曲线。表中列出了每个浓度下的平均准确度和精密性 (%RSD)

NIST SRM 1950 血浆为混合血浆，用以代表正常人血浆，并应具有代表平均人群的 MEL 浓度。通过加标至血浆提取物中的 MEL-D4 的外部校准曲线计算内源性 MEL。为了考虑样品前处理过程中的损失，使用预加标的 MEL-D4 的 MRM 峰面积观测值与预期值之间的比值对浓度计算值进行校正。采用稀释倍数 0.5 以确定血浆中 MEL 的最终浓度，分析了五份提取物重复试样（图 6）。

结论

本应用简报证明 Ultivo-ESI 具有与标准 Ultivo 系统相媲美的出色性能。它实现了定量研究血浆中低 ppt 级褪黑素所需的分析灵敏度。此系统也是一款经济适用的仪器，能够定量血浆中低浓度的内源性褪黑素，并且仅需极少的样品前处理。



提取物重复试样	RT (min)	% 预期定性离子比	浓度计算值 (pg/mL 提取物)	观测/预期 Mel-D4 比值	稀释倍数	最终浓度 (pg/mL 血浆)
血浆 1	4.535	103.5	71.2	0.80	0.5	44.5
血浆 2	4.535	98.0	73.9	0.96	0.5	38.5
血浆 3	4.535	96.9	75.9	0.96	0.5	39.5
血浆 4	4.535	108.0	76.5	1.01	0.5	37.9
血浆 5	4.535	95.4	75.6	0.87	0.5	43.4
					平均值 ±SD	40.8 ±3.0
					RSD%	7.3%

图 6. 人血浆中的内源性 MEL。此表列出了五份提取物重复试样中 MEL 的测量值和计算值。上图所示为血浆中内源性 MEL 的典型 MRM 色谱图

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。

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，2019
 2019 年 1 月 4 日，中国出版
 5994-0533ZHCN