Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用复合模式固相萃取法（SPE）去除血浆样本中的Triton X-100

Jonathan P. Danaceau、Erin Chambers and Kenneth J. Fountain
沃特世公司，美国马萨诸塞州米尔福德

应用优势

- 从血浆中去除Triton X-100
- 去除早期PK研究中与Triton X-100相关的离子抑制作用
- 无需方法开发，快捷、简易和洁净的样本制备方法

沃特世解决方案

Oasis® MCX 96孔板

ACQUITY UPLC® BEH C_{18}柱

关键词

赋形剂去除，Triton X-100去除，SPE，LC/MS，ESI，离子抑制，基质效应

引言

Triton X-100等药物赋形剂通常用于制剂药，以促进其在介质中的溶解度。然而，这些化合物却可引发显著的基质效应，尤以离子抑制为甚。常规药物研发流程中使用的快速LC梯度，又会导致此类化合物和目标分析物的共流出。早期药代动力学（PK）中，鉴于这种共流出已被证实是导致离子抑制作用的主要原因，赋形剂浓度偏高可能会导致严重问题[1-3]。为尽量减小这一问题引发的不良影响，目前已研究出的方法包括：LC梯度调节[2,3]，分析色谱柱的选择更换[1]，样本制备方法的改变[1-3]，样本的稀释[5]，甚至是全新制剂药的开发[4]。即便其中部分方法已取得成效，但每项方法仍存在其局限特性。很显然，分析员通常无法自己选择制剂药赋形剂。无论是改变梯度或流动相、还是更换不同选择性的色谱柱，优化LC条件能够针对部分分析物解决这一问题，但它既无法应用到全部分析物，也需要更多的方法开发作为辅助支持。同时，过多地调节或优化LC条件不利于高通量的操作。

Oasis复合模式阳离子交换（MCX）SPE法提供了一种快速、便捷、高效的解决方案。碱性分析物通过强阳离子交换作用被吸附在吸附剂中，而如Triton等的非离子型的赋形剂则通过反相机制被吸附，同时能够在分析物洗脱之前有选择性地被去除。

实验

样品制备

标准品包含醋丁洛尔、抗敏安、拉贝洛尔、美托洛尔、咪达挫仑、吲哚洛尔。这些成分或是在萃取之前加入到血浆样本、调整其浓度至200 ng/mL，或是后加标至萃取后的空白血浆洗脱液中，用于回收率的计算。萃取前，在血浆中加入5mg/mL浓度的Triton X-100，也可在萃取后添加至空白血浆洗脱液中，用于计算回收率。Triton X-100也可后加标至空白血浆洗脱液中，用于计算赋形剂的基质效应因子。

样品依照Oasis® MCX的基本操作流程进行萃取。简单来说，在0.5 mL兔血浆中加入0.5 mL 4% H_3PO_4进行酸化。（注意：本研究中采用的是0.5 mL血浆，采用更小剂量亦可）。MCX板在经过1.0 mL MeOH和1.0 mL H_2O活化平衡之后，经酸化的样品被上样到吸附剂上。上样后用1.0 mL 2%甲酸和2 × 1.0 mL MeOH清洗。样品随后用2 × 250 µL含5% NH_4OH的MeOH溶液进行洗脱。“后加标”（PS）样品是在空白兔血浆洗脱液中加入标准品或标准品与Triton X-100的混合物。经萃取的样品则以以下方式制备：在未经萃取的血浆中加入200 ng/mL标准品、或在其基础上再加入5 mg/mLTriton X-100。

Triton X-100去除的回收率依据以下算式得出：

% 回收率 = (萃取样品峰面积/后加标样品峰面积) × 100%

为进行Triton X-100去除的相关分析，样品按照1:200的比例在流动相中进行稀释，以避免高浓度Triton X-100给质谱仪带来的污染。

结果与讨论

六种测试化合物的色谱图如图1所示。标准品（醋丁洛尔、抗敏安、拉贝洛尔、美托洛尔、咪达挫仑、吲哚洛尔）提取MH+离子的SIR如图所示，除咪达挫仑，它的MH+离子与（MH-35）+离子合并成一个峰。图2为Triton X-100的两个色谱图。图中Triton X-100峰是丰度较大的Triton分子离子峰的综合TIC，包括以下分子量的Triton单峰：531、575、619、663、707、751和795。A图显示未经过SPE处理的血浆样本中Triton含量情况。它是将Triton后加标至萃取的最终血浆洗脱液中得到的。B图则为含有5 mg/mLTriton的血浆样本经标准MCX流程萃取得到的，该图表明血浆样品中几乎全部Triton X-100都得以去除。图3显示为实验所用样品组的平均Triton峰面积，如图所示，采用MCX萃取，超过99%的Triton得以去除。

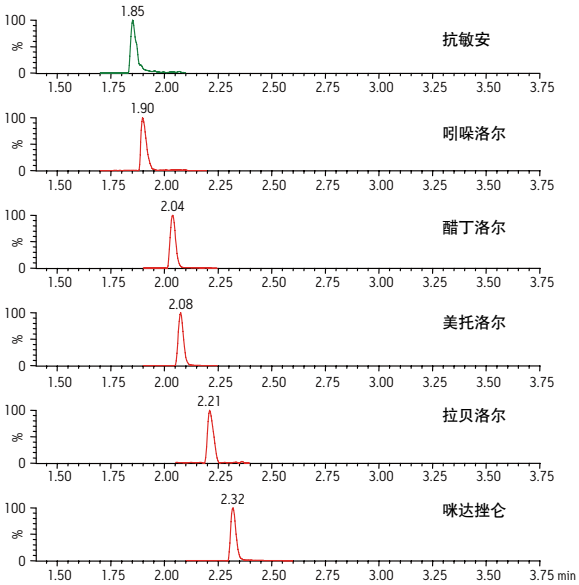

图1. 碱性药剂混合物色谱图。

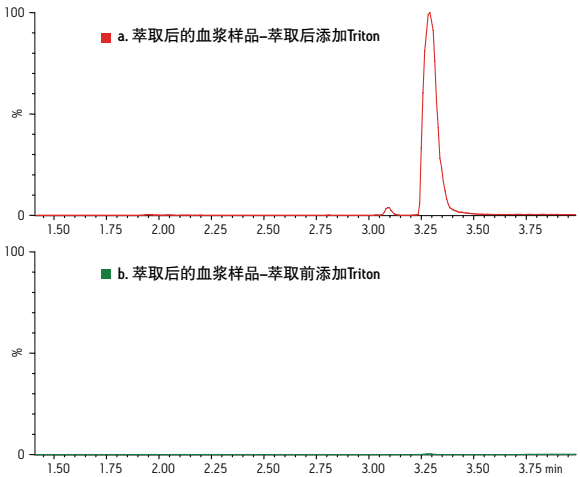

图2. 5 mg/mL Triton X-100-后加标色谱图和加标样品萃取色谱图。

方法条件

SPE条件

SPE板：	Oasis MCX 96孔板 30 µm (30 mg)
部件号：	186000248

液相色谱条件

液相色谱系统：	Waters ACQUITY UPLC系统
检测器：	Waters SQD
样品瓶：	2 mL 96孔收集板
部件号：	186002482
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C_{18} 1.7 µm, 2.1 × 50 mm色谱柱
部件号：	186002350
柱温：	30 °C
样品温度：	10 °C
进样量：	10 µL
流速：	0.5 mL/min
流动相A (MPA)：	0.1% HCOOH
流动相B (MPB)：	0.1% HCOOH乙腈

初始流动相条件为95:5 MPA:MPB。持续0.5分钟，MPB在2.5分钟之后增至95%。MPB比例随后降回5%，并持续2分钟，重新平衡色谱柱。总运行时间6.0分钟。

质谱条件

质谱系统：	Waters SQD
电离模式：	(+) ESI
采集模式：	SIR
毛细管电压：	2.5 kV
锥孔电压：	根据化合物有所区别 (针对不同分析物进行优化)
脱溶剂气体：	700 L/min.
锥孔气流：	0 L/min.

数据管理

软件系统：	MassLynx® V4.1 SCN714和MS 软件

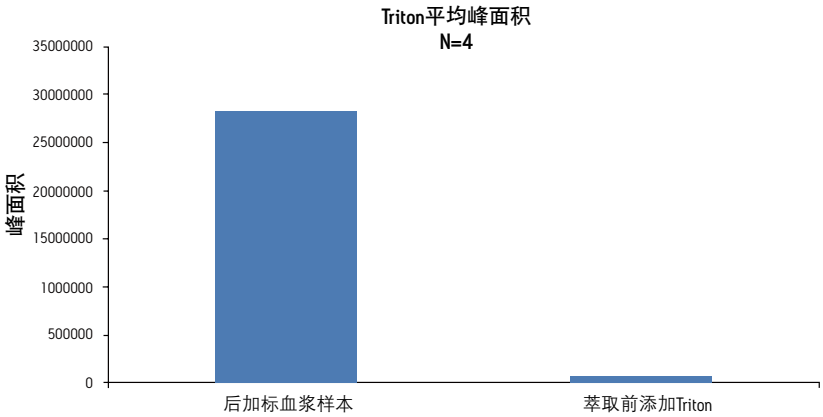

图3. 使用MCX从血浆中去除Triton。

按照前文方法的方程式计算分析物回收率。如图4所示，采用标准MCX流程后，每种分析物的回收率都达到99-105%。而对这六种分析物而言，平均回收率则达到102%。血浆中含有的5 mg/mL Triton X-100对于分析物回收率并无影响。在含有Triton的情况下，平均回收率为96%。

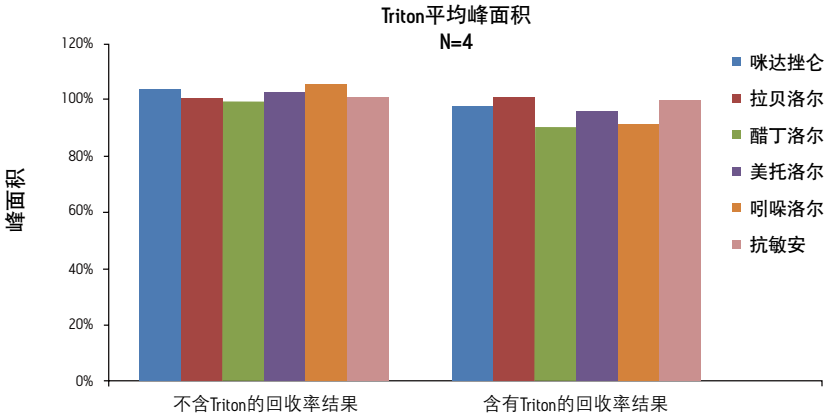

图4. 使用MCX去除血浆中的Triton。

将Triton X-100从血浆中去除的主要目的就是为了清除可能引发的离子抑制效应。根据APPS最新论文[6]，在含有Triton的情况下，使用下列算式计算的所有分析物的基质效应都接近（0.9-1.01；平均值=0.96）。原因在于，采用这种方法，分析物不会与Triton发生共流出，而赋形剂引发的基质效应多半发生于共流出过程中[1-3]。

基质效应 = (含Triton的峰响应值/不含Triton的峰响应值)

因此，为能鉴定分析物与Triton发生共流出时的基质效应，我们进行了柱后注入标准品的研究。简单来说，将药物混合物与色谱柱洗脱液一同注入MS。对比每种化合物的目标离子通道，我们就能评估Triton X-100对分析物信号强度的影响。图5所示为该实验范例。图A显示三种吲哚洛尔的MH+离子通道，以10 µL/min 的速度向洗脱液注入浓度为500 ng/mL的分析物。绿色通道显示萃取前加入药物混合物的血浆样本。紫色通道显示萃取前加入药物混合物和5 mg/mLTriton X-100的血浆样本。红色通道显示萃取后在样本洗脱液中加入Triton X-100的样品。图B显示含有Triton X-100的后加标样品色谱图以供比对。如图所示，若Triton未从样本中去除，吲哚洛尔（红色通道）显示80-90%的信号减弱。而当使用MCX去除Triton时（紫色通道），该抑制作用得以去除。其他分析物的分析结果相似。与Triton有关的50-85%离子抑制作用都通过MCX萃取去除。最重要的是，图2和3所示的数据，显示MCX不仅能够从血浆样本中去除99%的Triton，也能在含有Triton的情况下、完全去除其离子抑制作用。

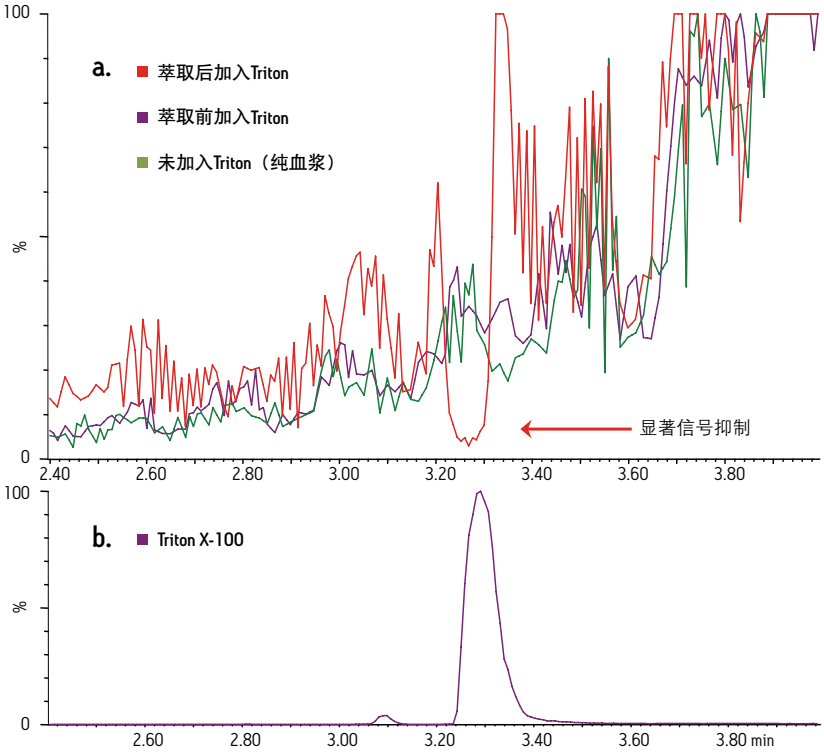

图5. 去除Triton的离子抑制作用（吲哚洛尔）。

结论

Oasis MCX 96孔板提供了一种用于去除血浆样品中高浓度Triton X-100的简便、快捷、高效的方法，从而消除早期药代动力学研究中常见的基质效应（通常是离子抑制效应）。此外，该解决方案无需进行色谱分析方法的再开发、样品的稀释、及其他费时费力的流程即可成功解决上述问题，这使得整个解决方案广泛适用于高通量分析的应用。

参考文献

1. Tong X, Wang J, Zheng S, Pivnichny J, Griffin P, Shen X, Donnelly M, Vakerich K, Nunes C, and Fenyk-Melody J., Effect of signal interference from dosing excipients on pharmacokinetic screening of drug candidates by liquid chromatography/mass spectrometry, Anal Chem 2002 74:6305-6313.
2. Weaver R and Riley R., Identification and reduction of ion suppression effects on pharmacokinetic parameters by polyethylene glycol 400, Rapid Comm Mass Spec 2006 20:2559-2564.
3. Shou W and Naidong W., Post-column infusion stude of the 'dosing vehicle effect' in the liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of discovery pharmacokinetic samples, Rapid Comm. Mass Spec 2003 17:589-597.
4. Temesi D, Law B, and Howe N., Synthesis and evaluation of PEG414, a novel formulating agent that avoids analytical problems associated with polydispersive vehicles such as PEG400, J. Pharmaceutical Sciences 2003 92(12):2512-2518.
5. Larger P, Breda M, Fraier D, Hughes H, and James C., Ion-suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry due to a formulation agent, a case study in drug discovery bioanalysis, J. Pharm. Biomed. Anal. 2005 39:206-216.
6. Bansal S and DeStefano A., Key elements of bioanalytical method development validation for small molecules, The AAPS Journal 2007 9(1):E109-E114.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、Oasis、ACQUITY UPLC和MssLynx是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2011年沃特世公司。印制于中国

2011年10月 720004157ZH LS-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com