Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用基于2D技术的ACQUITY UPLC分析干血斑和血浆中的瑞舒伐他汀

Claude Mallet[1]、Jennifer Simeone[2] 和 Paul Rainville[3]
[1]沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)分离科技工作流程整合团队
[2]沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)分离营销实验室
[3]沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)制药事业部

应用优势

- 无需蒸发和复溶步骤
- 稳定的样品制备过程
- 出色的重现性

沃特世解决方案

基于2D-LC技术的ACQUITY UPLC®

关键词

干血斑、血浆、2D色谱、柱头稀释

简介

在生物分析领域，动物和人体试验的主要内容是分析生物液体(尿液、血浆和血液)中目标分析物及其代谢产物。因此，使用了各种提取和分析技术来进行定性和定量分析。为了实现准确定量，必须从基质中分离出目标分析物[1,2]，所得到纯净且浓缩的提取物可以通过GC-MS或LC-MS进行痕量检测(ng/mL)分析。

在方法开发过程中，如果分析方案要求进行亚级(ppb)检测，通常都会包含一个富集步骤。因此，提取过程中需要大量样品。对于人体和大型动物试验而言，可提供足够的样品量(体积或质量)用于痕量水平分析。然而，对于临床前试验，来自小型啮齿动物(大鼠、小鼠、豚鼠等)的样品体积则少得多，可能会对采样频率有所限制。因此，“微量采样”的概念作为可能的替代方法受到关注。从物流角度讲，液体样品为装卸和运输增加了另一层困难。因此，“干血斑”(DBS)概念允许直接将微量-(<200 µL)样品采集到吸附剂支持卡上。经过充分的风干后，可以在室温下对干燥的样品进行存储和运输。当DBS卡运送至实验室，接下来的挑战就是从干燥的基质中分离出目标分析物。

DBS卡的提取过程需要使用穿孔切割技术从支持结构(通常是纤维素)上去除结合的物质。穿孔切割技术利用圆盘刀具切割DBS卡的固定表面。然后，使用水或有机溶剂(异丙醇、甲醇、乙腈等)对圆盘进行固-液萃取。水性萃取中，如果提取物的质量良好，则取一小份(10 µL)进行LC-MS/MS分析。然而，多数情况下，有机溶剂萃取的回收率更高。

实验

色谱和MS/MS条件

上样条件

色谱柱:	XBridge® C_{18}, 10 µm
上样:	水(pH 7)，无添加剂
流速:	0.8 mL/min
柱头稀释:	设置为20%稀释(0.2 mL/min泵A和0.8 mL/min泵B)

UPLC条件

UPLC®系统:	ACQUITY UPLC 2D，配置为“捕集和洗脱”及柱头稀释
运行时间:	10 min
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C_{18}, 2.1 × 50 mm, 1.7 µm
柱温:	30 °C
流动相A:	水+0.5%甲酸
流动相B:	乙腈+0.5%甲酸
洗脱:	流动相B在5分钟内以线性梯度从5%增加至55%
流速:	0.500 mL/min (泵 C)
进样体积:	500 µL

MS 条件

MS系统:	Xevo® TQ-S
电离模式:	ESI+
毛细管电压:	1.0 kV
锥孔电压:	60.0 V
源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	550 °C
脱溶剂气流速:	1100 L/h
锥孔气流速:	50 L/h

因此，在提取方案中必须增加溶剂转换步骤。该步骤通过使用蒸发和复溶步骤去除有机溶剂来完成。最常用的方法是利用氮气流进行蒸发，但并非易事：众所周知，这可能会引起蒸发损失并且可能造成回收率较低。

基于2D-LC技术的ACQUITY UPLC³允许进行水性和有机提取物的大体积进样(最高达1000 µL)，因此可以省去提取方案中的所有蒸发和复溶步骤。在本应用中，将一份15-µL的血液点样在Whatman DMPK B型支持卡上。将使用3mm打孔器取得的样品混悬于100 µL甲醇中。采用85 µL的进样体积可使检测限达到0.5 ng/mL，从而对瑞舒伐他汀进行LC-MS/MS分析。

甲醇、乙腈、甲酸和氢氧化铵购自Sigma-Aldrich Chemicals(美国密苏里州圣路易斯)。人血液购自Bioreclamation(美国纽约州希克斯维尔)并在使用前冷藏保存(血液在购买后7天内使用)。人血浆同样购自Bioreclamation并保存在-80°C下。瑞舒伐他汀和D6氘代内标物购自Toronto Research Chemicals(加拿大安大略)。将所需量的瑞舒伐他汀干粉溶解于甲醇中并用100%甲醇稀释，以制备用于加入到生物液体中的标准品。

通过在新鲜人血液中加入确证标准品溶液，制备血斑样品、校准曲线和QC。将一份15 µL的血液点样到Whatman DMPK B型支持卡上。使用3mm打孔器在所形成血斑的中心采样。然后，将这些中心样品混悬于100 µL甲醇中，振摇一小时。接着，将所获得的提取物在13,000的相对离心力(rcf)下离心五分钟。移取提取物溶剂，注入LC-MS/MS系统中。

通过在人血浆中加入所需浓度的确证标准品(常规标准品和氘代标准品)溶液，制备血浆样品、校准曲线和QC。然后，将一份100-µL的血浆与300 µL乙腈混合并涡旋，将所得的蛋白质沉淀样品在13,000 rcf下离心五分钟。移取上清液，注入LC-MS/MS系统中。

使用482 ⇒ 258通道监测瑞舒伐他汀，并使用488 ⇒ 264通道监测D6内标物。

结果

痕量水平检测与样品制备方案的富集因素和用于定量的进样体积直接相关。尽管反相色谱仍然是亲水性分析最常用的技术，但最终提取基质必须与分离条件兼容，避免在进样阶段体积或质量过载。为了实现高斯分布和分离良好的峰形，样品基质必须与初始流动相条件兼容，通常为高含水百分比(>95%)。因此，这一要求使样品制备的最后阶段增加了额外的工作时间。多数情况下，从其初始基质中提取的目标分析物具有较高的有机溶剂百分含量(异丙醇、甲醇、乙腈、丙酮等)。因此，提取物必须经过从高有机含量到高水含量的溶剂交换。这可通过增加蒸发干燥步骤实现，并接着用合适的溶剂复溶。最常用的温和氮气流方法也存在一些问题。有明确记载的事实显示氮气流蒸发可能导致蒸发损失和重溶不兼容。因此，这些最终步骤使得该提取方案费时费力。

在多维色谱领域，第二个维度的增加可以使峰容量、分离能力和分辨率方面的表现更好。联用色谱的灵活性和可扩展性使其成为在性能和工作流程方面经济有效的方法。基于2D-LC技术的ACQUITY UPLC³ 提供了大体积进样选择，并且与水性和有机提取物均兼容。增加进样体积可以使任何光学检测器或破坏性检测器的检测限提高100:1。能够使用水性和有机提取物进样也为样品制备方案带来了额外的突破性优势，并且因此可以省去样品制备方案中的任何或全部蒸发和复溶步骤。该功能是通过在使用单一高分辨率维度时从分离过程去除初始捕集阶段实现的。因此，在两个不同的液流间放置一个自定义捕集支持。第一个液流由高水含量流动相组成，能够在高k'下运行，以实现从流动相到固定相的最大快速传质。

在这一维度上，流速、pH和固定相保留强度是有效保留的关键参数。利用双液流(柱头稀释或ACD)进行上样，水性和有机提取物在达到捕集维度前进行了预稀释。通过单一液流和双液流注入溶于100%甲醇的10 µL瑞舒伐他汀提取物的效果如图1所示。单一液流上样的瑞舒伐他汀出现峰畸变。然而，利用柱头稀释可改善捕集效率，从而获得更强的信号。

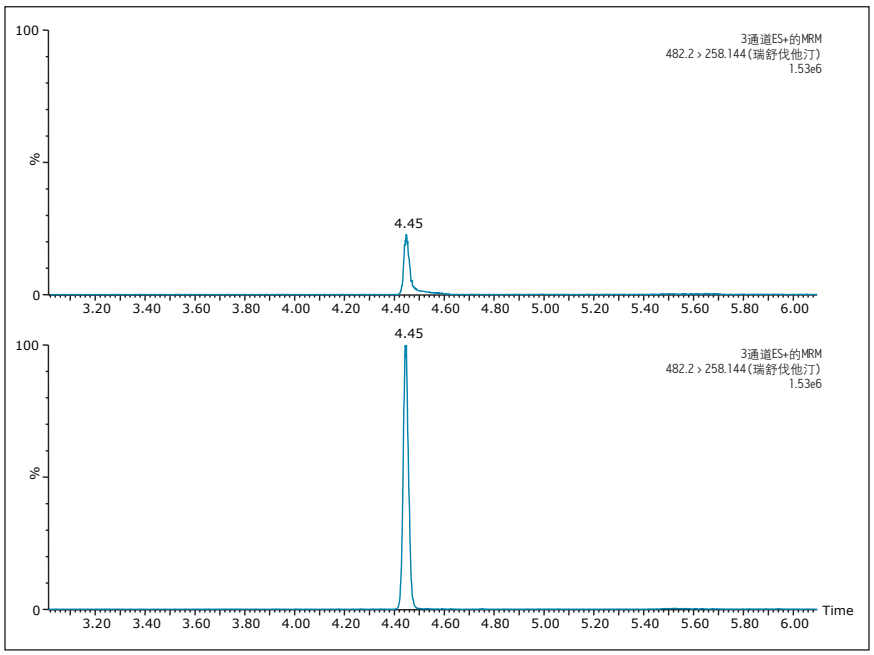

图1.溶于100%甲醇的瑞舒伐他汀在进行柱头稀释和不进行柱头稀释的情况下直接进样的结果比较。

对于任何分析方法，是否能达到最大灵敏度都是一个必须评估的方面。因此，使用1D和2D配置在水性和有机提取物中测量瑞舒伐他汀信号(见表1)。结果显示了两个重要方面。六次连续进样所得到的峰面积表现出优异的重现性，变异系数(CV)低于3%。结果显示1D和2D配置无显著差异。第二个观察到的现象是瑞舒伐他汀对2D配置下的甲醇提取显示出更高的响应。有机提取物中信号的增加说明潜在活性位点减少，通常与玻璃样品瓶有关。瑞舒伐他汀的核心化学结构中具有硫和氮结构，因为玻璃表面在水性条件下可以表现出离子交换能力(阴离子和阳离子)，有可能瑞舒伐他汀进行了额外的保留离子交换机制。由水到甲醇的转换只是将玻璃样品瓶的离子交换能力去活。保留率主要取决于目标分析物。在图2和图3中，两个测试样品在水性和甲醇条件下连续进样五次。图2中，水性提取物在第三次进样后显示出明显的信号减弱，在许多情况下可能会被错误地解读为潜在的残留问题。溶于甲醇中的提取物在全部五次进样中均显示出稳定的信号，值得指出的是在第一次进样时两种提取物的信号水平相似。在其他一些例子中，吸收速率可以很快。在图3中，水性提取物的五次连续进样保持恒定(e^6信号)，但在甲醇中同样的样品浓度显示出10倍的信号增强(e^7信号)。

峰面积 进样	1D H_2O	2D H_2O	2D ACD H_2O	2D ACD MeOH
1	3405	3251	3374	4083
2	3503	3245	3350	3996
3	3562	3425	3591	4089
4	3596	3486	3603	4114
5	3535	3431	3507	4008
6	3683	3421	3494	4064
AVG	3547.3	3376.5	3486.5	4059.0
STDEV	93.1	102.3	106.1	47.1
%CV	2.6	3.0	3.0	1.2

表1.采用各种LC配置和进样溶剂得到的瑞舒伐他汀峰面积。

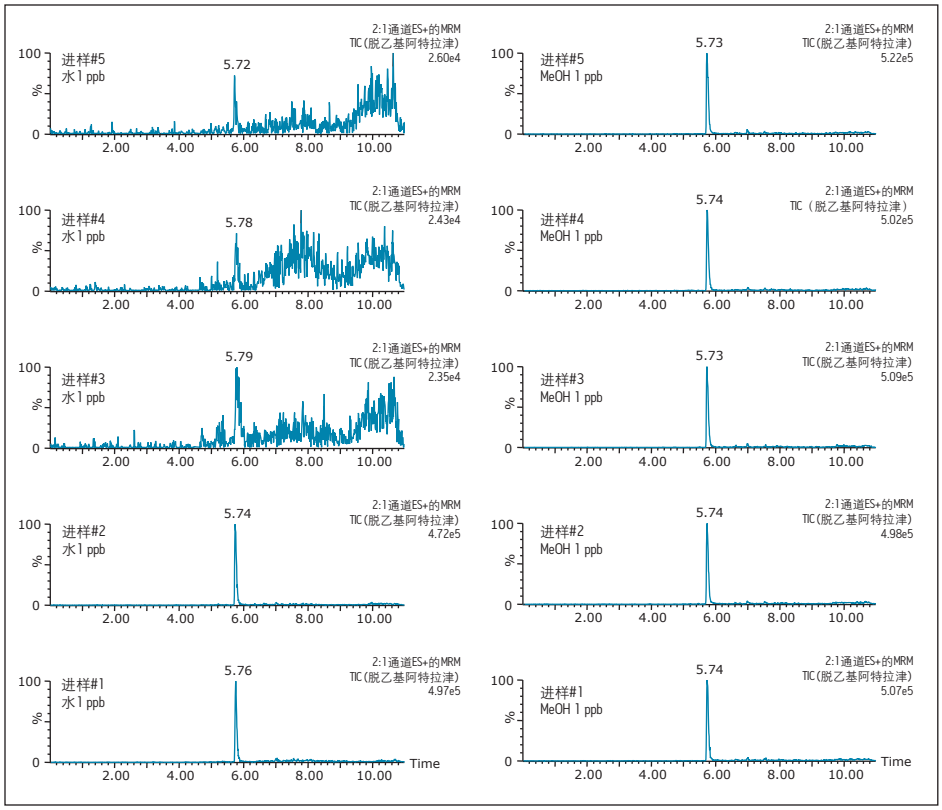

图2.使用脱乙基阿特拉津(早洗脱物)并进行了柱头稀释所得到的色谱图。

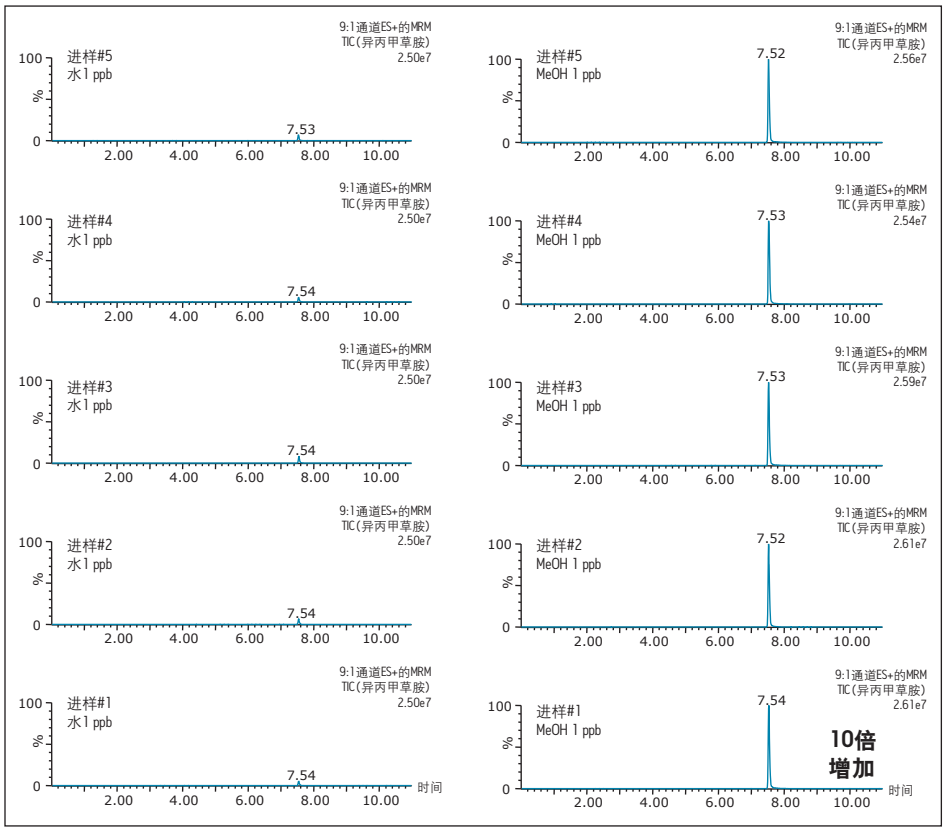

图3.使用脱乙基阿特拉津(晚洗脱物)并进行了柱头稀释所得到的色谱图。

线性和定量

为了比较，用甲醇浸泡干血斑，并与使用蛋白质沉淀方法的血浆基质分析相结合。两种提取物均显示出相似的样品复杂性，需要对低进样体积(<100 µL)和高有机百分含量下2D配置的稳定性进行评估。0.5 ng/mL干血斑中的瑞舒伐他汀和空白进样的代表性色谱图显示在图4中。其峰形清晰，且显示出高斯峰形。对于15 µL的起始体积，信噪比设置为20:1。根据FDA验证准则4，通过连续3天运行3次实验方案来验证实验方法。方法验证数据示于表2中，日间精度和准确度在0.5 ng/mL水平下显示出14.8%的偏差和4.0%的CV，在80 ng/mL水平下显示出1.4%的偏差和1.2%的CV。

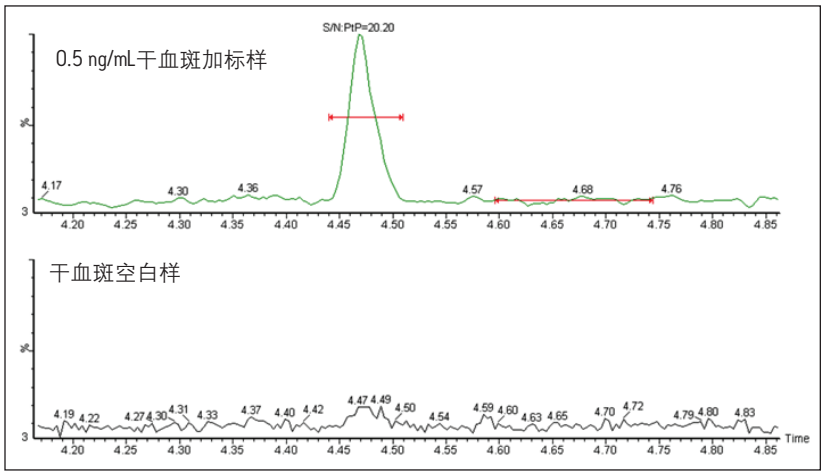

图4.用于分析干血斑中瑞舒伐他汀的LOQ (0.5 ng/mL)和在LLOQ后空白进样的色谱图。

在血浆实验中，将瑞舒伐他汀加入人血浆中并用乙腈以3:1沉淀比处理。LLOQ标准品以及在50 ng/mL标准品后进行空白进样所得到的代表性色谱图显示在图5中。在此我们可以看到2D解决方案提供了出色的色谱性能和非常清晰的色谱图。使用96孔样品板对血浆蛋白质沉淀方法进行一次运行验证。该方法在0.1–50 ng/mL范围内显示为线性，使用线性1/x权重获得的校准曲线r^2值为0.9995。

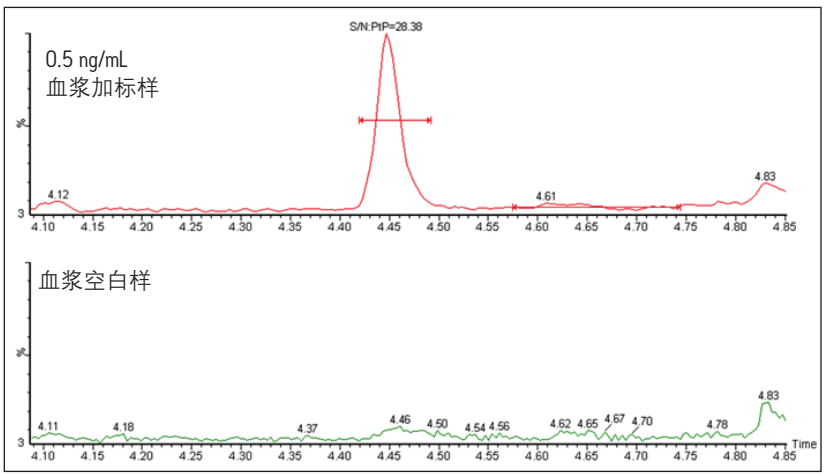

图5.用于分析经乙腈沉淀蛋白质后血浆中瑞舒伐他汀的LOQ (0.5 ng/mL)和在LLOQ后空白进样的色谱图。

	QC LLOQ 0.5 ng/mL	QC 低浓度 1.5 ng/mL	QC 中等浓度 30 ng/mL	QC 高浓度 80 ng/mL
平均值	0.574	1.55	29.9	81.1
标准差	0.0230	0.0249	0.432	1.01
CV%	4.0	1.6	1.4	1.2
偏差%	14.8	3.2	-0.2	1.4
重复次数	18	18	18	18

表2.干血斑中瑞舒伐他汀分析的3天日间准确度/精度统计。

结论

使用基于2D-LC技术的ACQUITY UPLC从干血斑和血浆样品中获得的结果展示出了大体积进样(高有机百分含量)和从提取方案中省去蒸发和复溶步骤的优势。省时的工作流程还显示了出色的重现性和稳定性。此外，与水性提取物相比，该方法还在高有机百分含量基质条件下表现出MS信号增加。

参考文献

1. Biddlecombe RA, Pleasance S, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.,* 734(2), 257–65, 1999.
2. Biddlecombe RA, Benevides C, Pleasance S, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 15(1), 33–40, 2001.
3. Mallet C, Time De-Coupled Chromatography, A Novel Technique, Waters Corporation, 720005125EN, 2014.
4. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001, http://www.fda.gov/downloads/DrugsGuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf.

扫一扫，关注沃特世微信

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY UPC², Xevo和UNIFI是沃特世公司的注册商标。Trefoil和Torus是沃特世公司的商标。所有其它商标均为其各自所有者的资产。

©2014年 沃特世公司 中国印刷 2014年12月 720005213ZH AG-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 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

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