

Application News

No. C153

LC/MS

全自动前处理 – LC/MS/MS 系统分析 人血浆中抗心律失常药物

药物剂量控制在临床药物治疗过程中属于难点。例如治疗范围狭窄或疗效与毒性存在交叉。因此，患者的血药浓度的测定，决定了最佳给药剂量，以及基于药代动力学、药效学分析的个人药物治疗方案。“应用新闻 C123”介绍了一款使用全自动前处理 – 高效液相色谱串联质谱 (LCMS) 系统 CLAM-2000 用于工作流程优化的相关研究。

本文使用该全自动前处理 – LC/MS/MS 系统，对 6 种抗心律失常药物实现快速、同时分析。

S. Iwasaki

■ 血浆中抗心律失常药物的全自动前处理分析

一般血浆样品的前处理，采用有机溶剂沉淀蛋白后，离心除去沉淀并分离上清。而全自动前处理 LC/MS/MS 系统，在设置采血管后，即可全自动的进行上述前处理，并连续进行 LC/MS/MS 分析 (图 1)。下一样品的前处理也可以与 LC/MS/MS 分析同时进行，可大幅缩减单个样品分析时间。

在本文中，使用自动化前处理 – LC/MS/MS 对 6 种抗心律失常药物以及代谢产物进行同时分析，每个血浆样品的前处理和分析仅 7 分钟 (表 1 和图 2)。

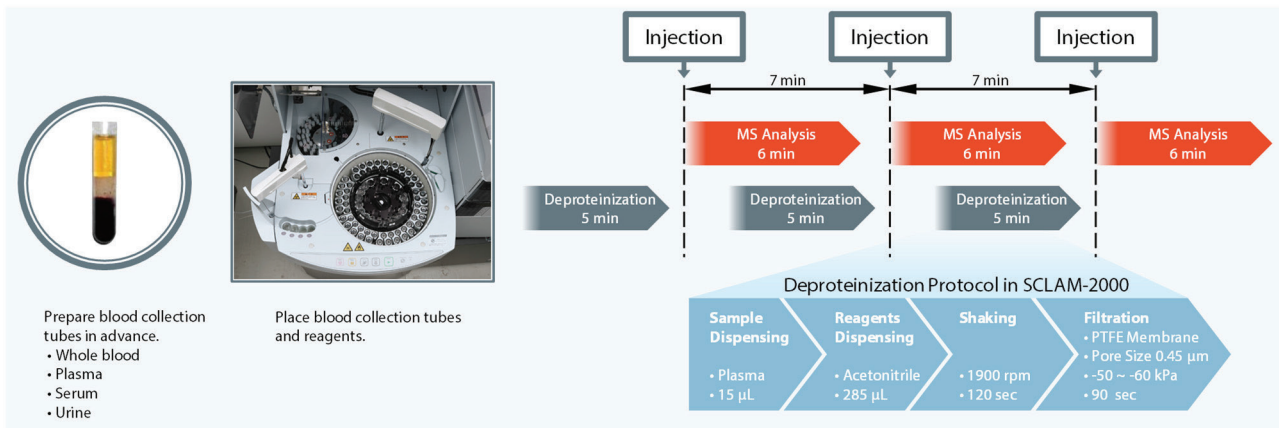


图 1 血浆样品的前处理流程

表 1 抗心律失常药物及其代谢产物

Compound	Molecular Formula	MRM Transition m/z
Amiodarone	C ₂₅ H ₂₈ I ₂ NO ₃	646.0 > 58.1
Desethylamiodarone*	C ₂₃ H ₂₆ I ₂ NO ₃	618.0 > 72.1
Bepidil	C ₂₈ H ₃₄ N ₂ O	367.1 > 84.1
Flecainide	C ₁₇ H ₂₀ F ₄ N ₂ O ₃	415.0 > 301.0
Pilsicainide	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O	272.9 > 110.1
Cibenzoline	C ₁₆ H ₁₈ N ₂	262.9 > 115.0
Mexiletine	C ₁₁ H ₁₇ NO	180.1 > 58.0

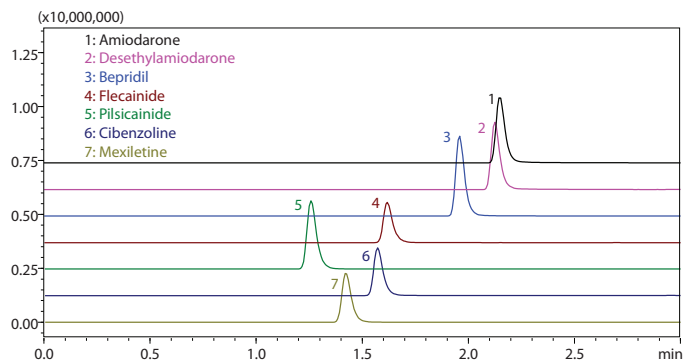


图 2 人血浆样品加标色谱图

全自动前处理分析方法验证

采用对照血浆加标绘制校正曲线，并根据 QC 样品 (n = 5) 分析结果，对准确度和精密度进行评价：(表 2)。所有的抗心律失常药物在浓度范围内线性良好。QC 样品的回收率，包括最低定量限，均处于 100 ± 15% 的范围内。此外，精密度 (%RSD) 也位于 15% 的范围内，重现性良好。

在分析校正曲线的最高浓度样品后立即测量空白血浆，对全自动前处理 LC/MS/MS 系统中的残留进行了确认。与校正曲线中最低浓度样品的峰强度值相比，所有药物均未有明显的残留 (图 3)。

根据以上结果，本文所使用的全自动前处理 LC/MS/MS 系统在对样品进行连续分析时，具有线性范围宽，定量可靠的特点。

表 2 抗心律失常药物和代谢产物同时分析方法学评价

Compounds	Cal. Range [ng/mL]	Correlation Coefficient R	Accuracy %				Precision %RSD, n=5			
			LLOQ	Low	Medium	High	LLOQ	Low	Medium	High
Amiodarone ^{*1}	100–3000	0.9983	98.3	100.6	99.4	103.9	4.1	2.9	3.0	2.7
Desethylamiodarone ^{*1}	100–3000	0.9987	99.2	98.9	101.1	100.3	5.3	4.2	3.6	4.2
Bepiridil ^{*2}	50–1500	0.9992	100.9	100.5	96.6	103.4	4.1	3.7	2.3	1.8
Flecainide ^{*2}	50–1500	0.9987	98.1	98.7	96.7	101.4	4.7	3.3	2.4	2.4
Pilsicainide ^{*1}	100–3000	0.9987	100.4	99.6	97.3	104.8	4.0	3.0	1.8	2.0
Cibenzoline ^{*2}	50–1500	0.9987	102.4	101.4	99.1	102.9	4.2	3.4	3.0	2.4
Mexiletine ^{*1}	100–3000	0.9984	104.5	107.4	106.3	107.8	3.8	3.9	2.6	2.6

*1: 100 ng/mL for LLOQ, 250 ng/mL for Low, 1000 ng/mL for Medium, 3000 ng/mL for High
*2: 50 ng/mL for LLOQ, 125 ng/mL for Low, 500 ng/mL for Medium, 1500 ng/mL for High

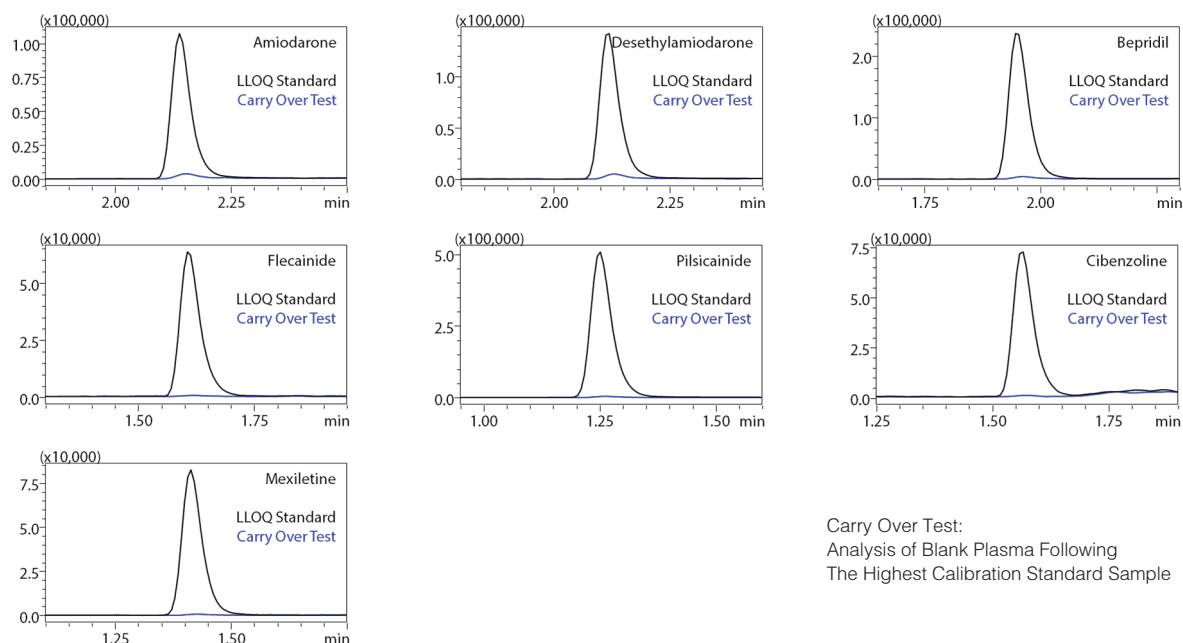


图 3 残留确认试验结果

表 3 分析条件 (方法学评价)

System	: SCLAM-2000 + Nexera + LCMS-8060		
Protocol	: Plasma disp. 15 µL - Acetonitrile disp. 285 µL - Shaking 1900 rpm, 120 sec - Filtration 90 sec		
Column	: Shimadzu GLC Mastro C18 (50 mmL, × 2.1 mmI.D., 3 µm)		
Mobile Phase	: A 0.1% Formic acid - Water, B 0.1% Formic acid - Methanop		
Flow Rate	: 0.4 mL/min		
Time program	: B Conc. 10% (0 min) - 100% (2 - 3.5 min) - 10% (3.51 - 6 min)		
Column Temp.	50°C	injection Volume	: 0.2 µL
Probe Voltage	: 2.0 kV (ESI-positive mode)		
Interface Temp.	: 300°C	DL Temp.	: 250°C
Block Heater Temp.	: 400°C	Nebulizing Gas Flow	: 3 L/min
Heating Gas Flow	: 10L/min	Drying Gas Flow	: 10 L/min

与手动前处理法之间的对比试验

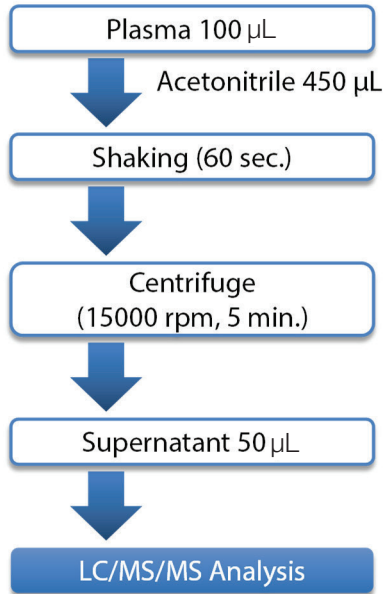
对比了手动前处理法和全自动前处理 LC/MS/MS 系统，用于血浆中胺碘酮浓度的测定。

手动前处理法通过手动分离血浆，添加乙腈，混合进行除蛋白。离心分离样品后，将上清转移至小瓶中进行 LC/MS/MS 分析。另一方面，全自动前处理分析法从分离血浆到 LC/MS/MS 分析的全工艺流程均采用本报告中的系统自动进行 (图 4)。

对比不同方法之间，胺碘酮及其代谢产物—脱乙基胺碘酮的定量结果 (图 5、图 6、表 4 和表 5)。在较宽的浓度范围内，手动前处理法和全自动前处理分析法的定量结果具有良好的—致性。此外，根据上述结果计算的两种方法的相关系数 $R^2 \geq 0.95$ (图 7 和图 8)。

本文所使用的全自动前处理分析法系统能得到与传统手动前处理法—致的定量结果，且更加迅速，降低实验人员负担，有相当乐观的应用前景。

Manual Pretreatment



Automated Pretreatment with SCLAM-2000

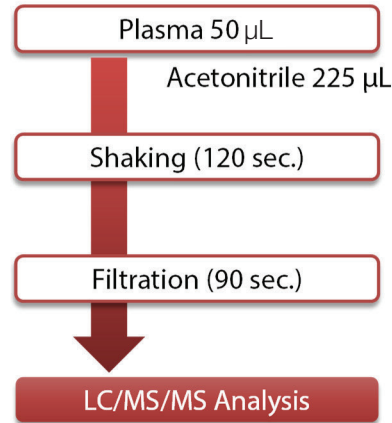


图 4 手动前处理和全自动前处理分析法的工作流程

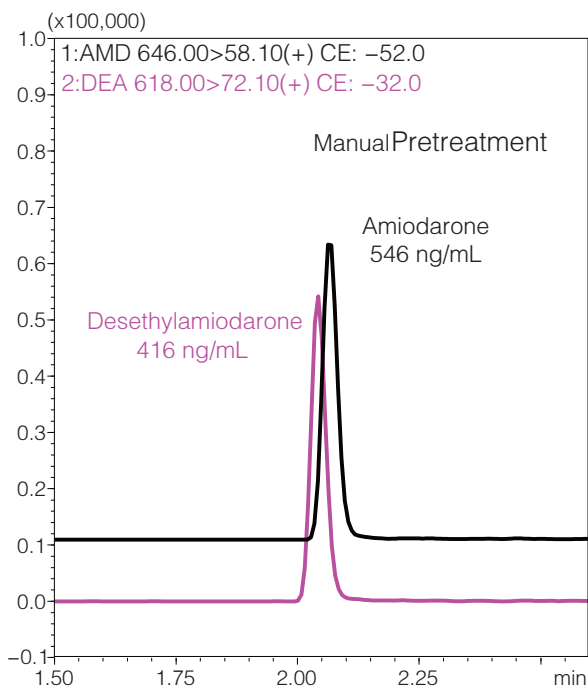


图 5 手动前处理人血浆 (Sample 3) 分析结果

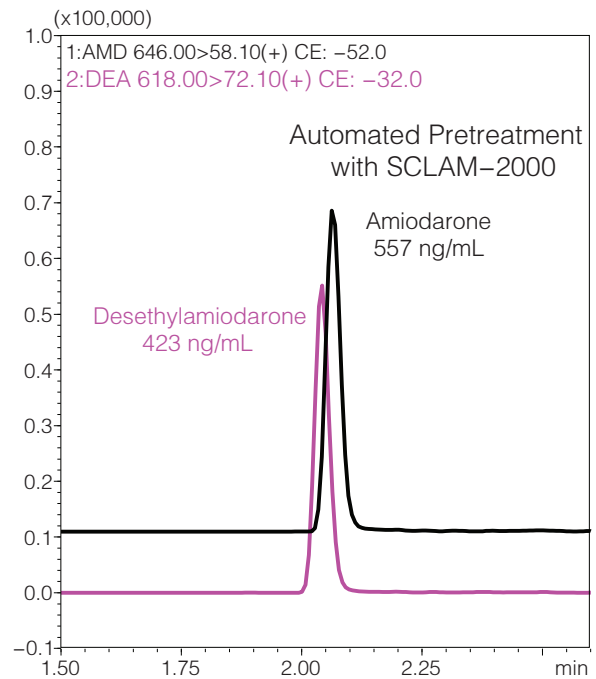


图 6 全自动前处理分析人血浆 (Sample 3) 分析结果

表 4 手动前处理和全自动前处理分析法的定量结果 (胺碘酮)

	Amiodarone		
	Manual [ng/mL]	Automated [ng/mL]	Ratio %*
Sample 1	373	411	110.2
Sample 2	399	404	101.3
Sample 3	546	557	102.0
Sample 4	205	211	102.9
Sample 5	963	895	92.9
Sample 6	1,318	1,213	92.0
Sample 7	1,271	1,229	96.7
Sample 8	1,233	1,282	104.0
Sample 9	2,259	2,208	97.7
Average			100.0
RSD %			5.8

* Automated Pretreatment / Manual Pretreatment

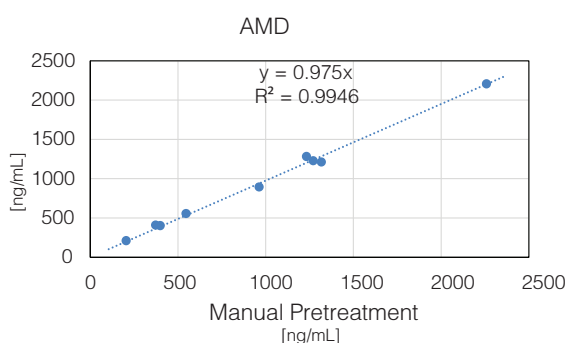


图 7 胺碘酮的定量结果比较

表 5 手动前处理和全自动前处理分析法的定量结果 (脱乙基胺碘酮)

	Desethylamiodarone		
	Manual [ng/mL]	Automated [ng/mL]	Ratio %*
Sample 1	304	271	89.1
Sample 2	412	366	88.8
Sample 3	416	423	101.7
Sample 4	271	240	88.6
Sample 5	717	654	91.2
Sample 6	151	150	99.3
Sample 7	431	408	94.7
Sample 8	664	628	94.6
Sample 9	940	1,080	114.9
Average			95.9
RSD %			8.9

* Automated Pretreatment / Manual Pretreatment

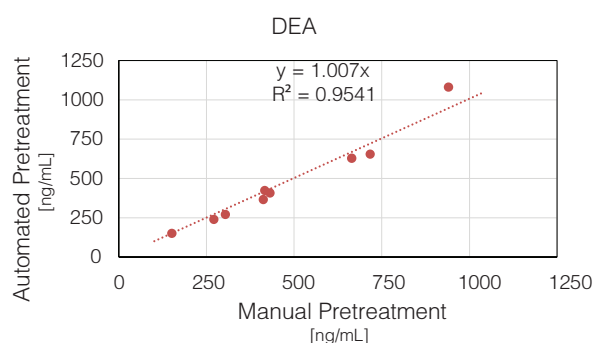


图 8 脱乙基胺碘酮的定量结果比较

表 6 分析条件 (前处理法对照试验)

System	: SCLAM-2000 + Nexera + LCMS-8040		
Protocol	: Plasma disp. 50 µL - Acetonitrile disp. 225 µL - Mixing 1900 rpm, 120 sec - Filtration 90 sec		
Column	: Shimadzu GLC Mastro C18 (50 mmL. × 2.1 mmI.D., 3 µm)		
Mobile Phase	: A 0.1% Formic acid - Water, B 0.1% Formic acid - Methanol		
Flow Rate	: 0.4 mL/min		
Time program	: B Conc. 10% (0 min) - 100% (2 - 3.5 min) - 10% (3.51 - 6 min)		
Column Temp.	: 50 °C	Injection Volume	: 0.1 µL
Probe Voltage	: 4.5 kV (ESI-positive mode)		
DL Temp.	: 250 °C	Block Heater Temp.	: 400 °C
Neb. Gas Flow	: 3L/min	Drying Gas Flow	: 15 L/min

致谢

本资料的研究过程中得到了国立心血管研究中心医院 (国家研究开发局) 药剂部岛本裕子老师的大力支持

- 参考文献
- Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation (2001, US FDA)
 - 药物研发过程中生物样品中药物浓度分析法的验证相关指南 (2013 年, 厚生劳动省)

- 注)
- 本文件中记载的产品未能基于医药品医疗器械法作为医疗器械获批。无法以治疗诊断为目的, 无法通过正常程序使用。
 - 本文件中记载的样品均由国立心血管研究中心医院采集和测量。我们已获得关于测量数据刊载的授权。



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

- * 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
 - * 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
- 如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2017 年 5 月