

微流 LC/MS/MS 用于超微量血浆试样 中药物的高灵敏度分析

众所周知，通常情况下，药物等衍生物质会通过活体内的代谢，促进向体外排泄和解毒。因此，在药物研发中，会通过临床前试验和临床试验评价体内药物代谢动力学。¹⁾

在临床前的药代动力学试验当中，使用 LC/MS/MS 等分析动物试验中所得生物样本的药物及代谢产物浓度。

此时，可以安全采集的试样量因不同动物种类而受到限制，因此根据动物种类的不同，有时需要大批量的试验动物和药物，从伦理及经济性的观点来看已成为一大课题。

解决该课题的方法是发展微量样本的高灵敏度的 LC/MS/MS 分析技术，同时发展试样微量采集（微量取样）技术。

本文向您介绍利用微流 LC/MS/MS 技术，实现超微量血浆试样中药物高灵敏度分析的案例。

D. Vecchiotti, K. Matsumoto

■ 微流量液相色谱质谱分析仪系统 Nexera Mikros™

此次研究中使用了岛津 Nexera Mikros 微流量液质联用系统（图 1）。该系统可在微量或半微量（1~500 $\mu\text{L}/\text{min}$ ）的较宽的流量范围之间进行流动相输送的。



图 1 微流量 LC-MS 系统 “Nexera Mikros™”

与流速在 100~500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 左右流量范围内的半微量 LC / MS 系统相比，Nexera Mikros 使用数百 nL/min ~1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流量范围，可以检测到目标组分的灵敏度更高，分析时间更短、可靠性更高。

此外，图 2 所示为捕集时及洗脱时的流路图。由于乙腈常作为蛋白沉淀剂使用，直接注入时谱峰形状会因乙腈的洗脱而出现展宽，限制了进样体积。为抑制由于样品溶剂导致的色谱峰展宽，Nexera Mikros 采用了捕集 - 洗脱的方式进行上样。将目标化合物固定在捕集色谱柱上之后（捕集），切换阀门，利用分析用流动相反冲洗，将目的化合物送至分析色谱柱（洗脱），进行分离、检测。

■ 样品制备

向血浆试样（2 μL ）中的添加了 Verapamil 和 Nor verapamil，如图 3 所示。加标样品添加 58 μL 蛋白沉淀剂（包含 0.1 % 甲酸乙腈、内标物质 Verapamil-d6）。在室温下静置 20 分钟后，进行离心分离，将上清液移至样品瓶，注入 5 μL 进行分析。

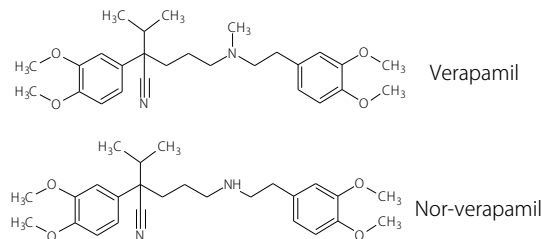
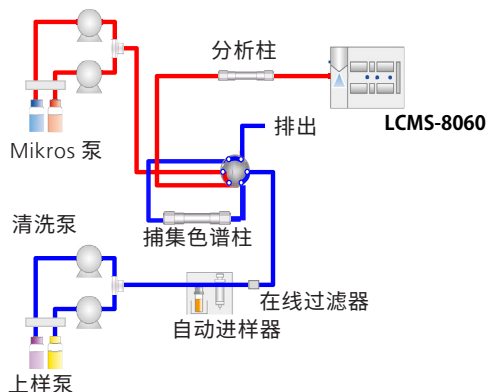


图 3 Verapamil 及其代谢产物 Nor-verapamil 的化学结构式

A) 捕集时



B) 洗脱时

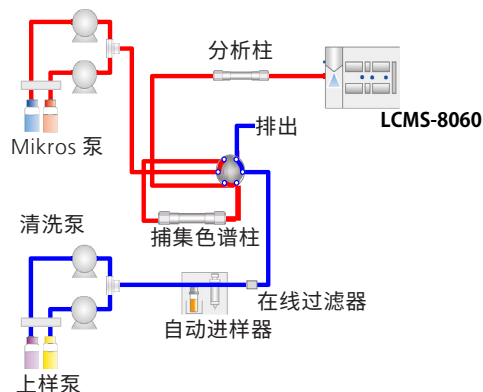


图 2 捕集及洗脱时的流路图

分析条件

Nexera Mikros 的 HPLC 及 MS 的条件如表 1 和表 2 所示。向捕集色谱柱装载的试样采用含 0.1% 甲酸的水/乙腈=98/2 溶解，通过含 0.1% 甲酸的水和乙腈梯度溶液进行分析。使用清洗泵将 100% 乙腈送至捕集色谱柱，进行清洗。此外，还使用同样的装置结构，比较了微量流量和半微量流量。

表 1 LC 条件 (微量流量)

分析柱	: Shim-pack™ PLONAS Biphenyl (2.7 μm, 100 mm×0.2 mm I.D.)
阱色谱柱	: Shim-pack™ MCT LC8 (5 μm, 5 mm×0.3 mm I.D.)
温度	: 40 °C
流动相 A	: 水 +0.1% 甲酸
流动相 B	: 乙腈 +0.1% 甲酸
流速	: 250 μL/min (上样), 4 μL/min (洗脱)
梯度	: B 浓度 26% (0-1min) 至 95% (4-5 min)
进样量	: 5 μL

表 2 MS 条件

离子源	: Micro ESIMicro-ESI 8060
接口电压	: +2.6kV (正离子)
温度	: 接口: 不加热 脱溶剂管: 250°C 加热模块: 400°C
气流	: 雾化气: 1L/min 加热气: -- 干燥气: --
MRM	: (定量/定性)
	Verapamil (455.0 > 150.25 / 455.0 > 303.3 (165.2))
	Nor verapamil (440.95 > 165 / 440.95 > 150)
	Verapamil D6 (461.3 > 309.3 / 461.3 > 165.25 (150.25))

微量流量分析的信号强度评价

添加了 Verapamil 和 Nor verapamil 的血浆 (校准点最小浓度, 0.5 μg/L), 用于评价了微量流量分析对目标化合物信号强度带来的效果。保持试样注入量及色谱柱内线速度一致, 比较了微量流量及半微量流量下的信号强度。在微量流量条件下使用了微量流量用电离装置 Micro-ESI8060 作为离子源, 在半微量流量条件下使用了标准的 ESI 电离装置。各分析条件如表 3 所示。

表 3 微量流量和半微量流量的分析条件

参数	微量 LC/MS/MS 法	半微量 LC/MS/MS 法
进样模式	捕集和洗脱	直接
进样体积 (μL)	5	5
流速 (μL/min)	4	441
分析柱	0.2×100 mm, 2.7 μm	2.1×100 mm, 2.7 μm
线速度 (cm/sec)	4.145	4.145
样品浓度 (ng/L)	0.5	0.5

本文中描述的产品尚未根据日本《药品和医疗器械法》被批准为医疗器械。无法用于治疗诊断或其他相关程序。

Nexera Mikros 和 Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。

微量流量时的信号强度与半微量流量时相比, Verapamil 增加了 4.5 倍以上, Nor verapamil 增加了 3.5 倍以上 (图 4)。以上表明, 样品量相同情况下, 使用微量流量方法可以提高灵敏度。

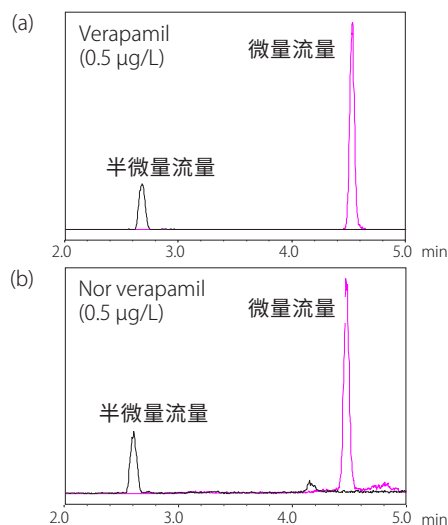


图 4 微量流量与半微量流量的 (a) Verapamil、(b) Nor verapamil 的信号强度比较 (0.5 μg/L 时的加标血浆样品)

标准曲线的线性

图 5 所示为按照内标法绘制的标准曲线 (1/X 加权的线性回归模型)。Verapamil 与 Nor verapamil 的线性均在 $R^2=0.998$ 以上, 且线性的准确度良好 (图 5、表 4)。

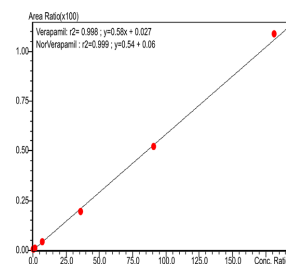


图 5 Verapamil 的标准曲线

表 4 微量流量和半微量流量的标准曲线误差率

浓度 (μg/L)	准确度 % (Verapamil)	准确度 % (Nor verapamil)
0.5	101.4	94.2
0.9	110.7	108.4
1.8	93.9	91.2
7.3	100.5	108.5
36.3	93.5	98.1
90.8	97.3	98.9
181.6	102.6	100.7

结论

使用微量流量液相色谱质谱分析系统 Nexera Mikros, 进行了 Verapamil 与 Nor verapamil 的定量。通过捕集、洗脱的方式, 抑制样品溶剂导致的峰谱展宽。

在生物样品中药物定量分析时, 相比普通的半微量流量条件, 在微量流量条件下进行检测可以获得更高的灵敏度。由此可得出, 使用微量流量 LC/MS/MS, 微量血浆样品, 仍可获得良好的分析结果。

微量流量 LC/MS/MS 可应用于早期药代动力学研究。

< 参考文献 >

- 1) Rapid Commun. Mass Spectrom. 2014, 28, 1293-1302.

岛津应用云



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: 2020 年 6 月