

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定抗肿瘤药物及其代谢物

LCMSMS-009

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8030联用快速测定抗肿瘤药物(代号HD)及其代谢物(代号HD-M)。样品用超高效液相色谱LC-30A分离，三重四极杆质谱仪LCMS-8030进行外标法定量分析，在1.2分钟内完成检测。HD在0.05 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ ，HD-M在0.1 ~ 10 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在0.999以上；对0.5 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 和50 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验，连续6次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在0.182%和2.780%之下，系统精密度良好；HD定量限为0.005 $\mu\text{g/L}$ ，HD-M定量限为0.1 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词： 抗肿瘤新药 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

肿瘤在医学上是指细胞的异常病变。这一种病变，使身体部分细胞有不受控制的增生，许多时候会集结成为肿块。肿瘤大致可分为良性肿瘤及恶性肿瘤。癌症即是最常见的恶性肿瘤。目前在全球处方药市场中，抗肿瘤药物增长势头最快，有报告预计在近1-2年其将超过降血脂药成为市场销售冠军。抗肿瘤药分为烷化剂、抗代谢类、抗生素类、天然来源类、激素类和其他类等。本文分析的对象HD和HD-M属于天然来源类抗肿瘤药物，分子量分别为490和314，其中HD-M是HD的代谢物。目前处于新药研发过程中，化合物名称和结构属于保密阶段。本文使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8030联用快速测定抗肿瘤药物HD和HD-M，给出了线性范围、重复性和灵敏度测试结果。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A与三重四极杆质谱仪LCMS-8030联用系统。具体配置为LC-30AD \times 2输液泵，DGU-20A5在线脱气机，SIL-30AC自动进样器，CTO-30AC柱温箱，CBM-20A系统控制器，LCMS-8030三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.41色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D. \times 50 mm L., 1.6 μm

流动相：A - 0.1%甲酸水溶液；B - 乙腈

流速：0.5 mL/min

进样体积：20 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为50%，时间程序见表1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.40	Pumps	Pump B Conc.	90
0.70	Pumps	Pump B Conc.	90
0.71	Pumps	Pump B Conc.	10
1.20	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI(+)

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氦气

脱溶剂管温度: 250℃

加热模块温度: 400℃

定性扫描范围: Q3scan: m/z 150-600;

Product ion scan: HD m/z 100-500,

HD-M m/z 100-350;

检测模式: 多反应监测(MRM)

驻留时间: 20 ms

延迟时间: 3 ms

MRM参数: 见表2

表2 MRM参数

No.	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	HD	491.35	315.20	-10.0	-25.0	-25.0
2	HD-M	315.35	244.40	-10.0	-25.0	-19.0

1.3 样品制备

标准溶液配制: 取500 ng/mL的HD和HD-M混标储备液, 用流动相稀释成50、10、5、1、0.5、0.1、0.05 ng/mL的不同浓度混标工作液, 分别经0.22 μm滤膜过滤后进样。

结果讨论

2.1 标准样品的定性结果和MRM色谱图

2.1.1 HD分析结果

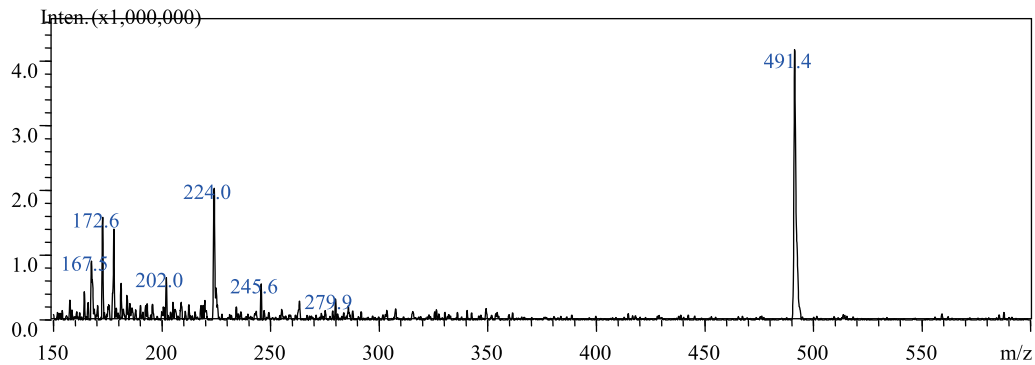


图1 HD单标Q3 Scan 质谱图

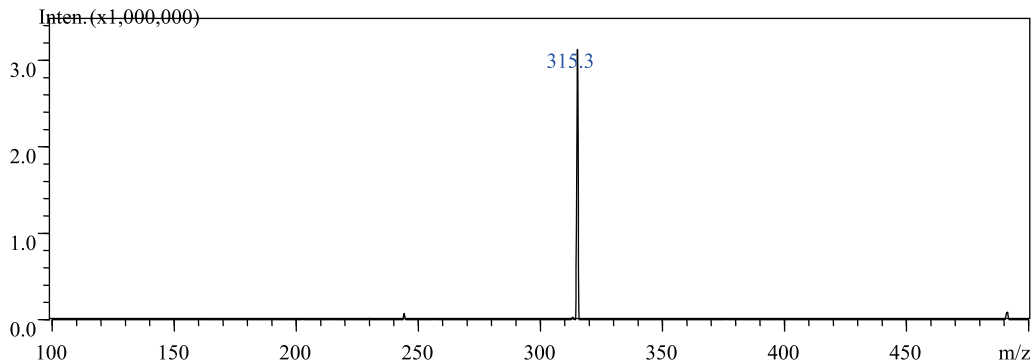


图2 HD单标Product ion scan 质谱图

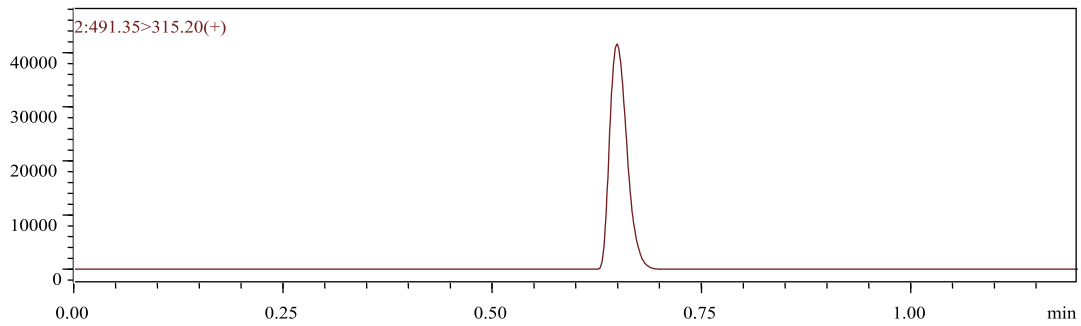


图3 HD MRM模式色谱图(1 ng/mL)

结果表明HD前体离子和产物离子质量数与理论值吻合。

2.1.2 HD-M分析结果

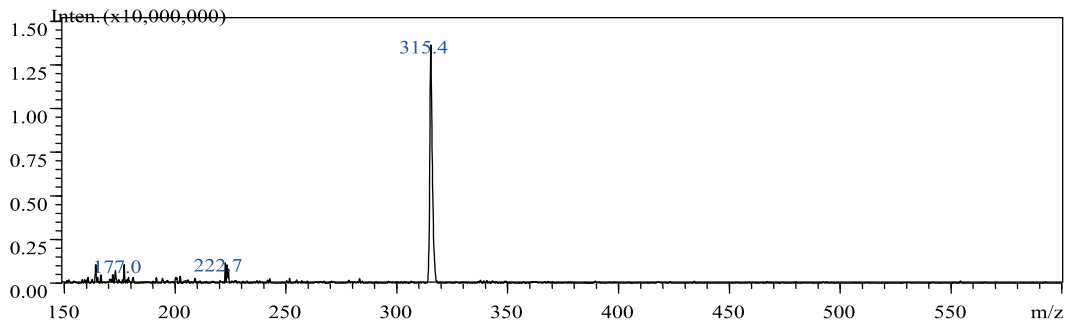


图4 HD-M单标Q3 Scan 质谱图

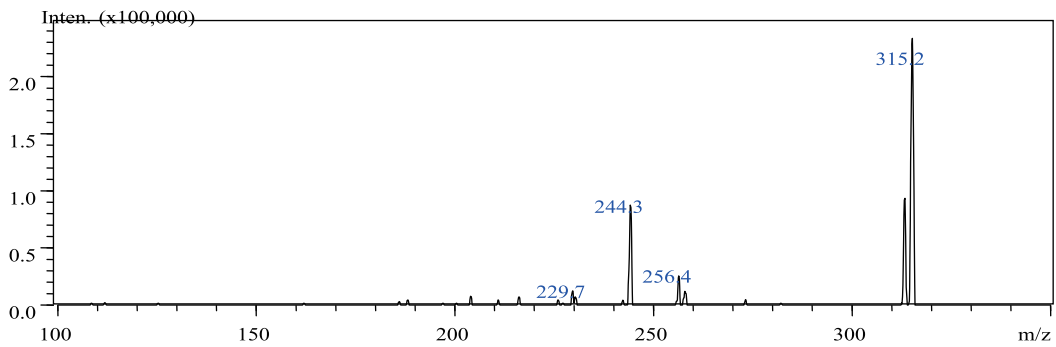


图5 HD-M单标Product ion scan 质谱图

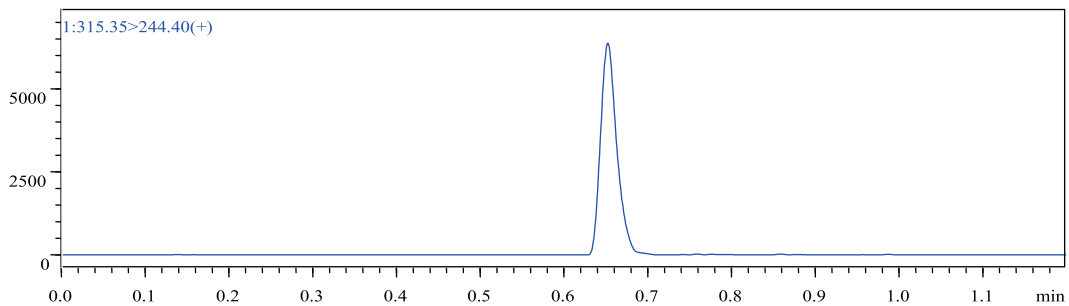


图6 HD-M MRM模式色谱图(1 ng/mL)

结果表明HD-M前体离子和产物离子质量数与理论值吻合。

2.2线性关系

将浓度为0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液按1.2中的分析条件进行测定, 均用外标法定量计算; 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线如图7~8所示; 所得校准曲线线性关系良好, 线性方程及相关系数见表3。

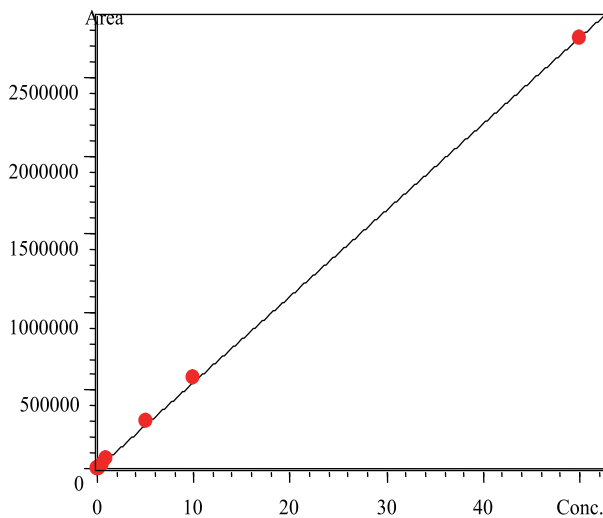


图7 HD的标准工作曲线

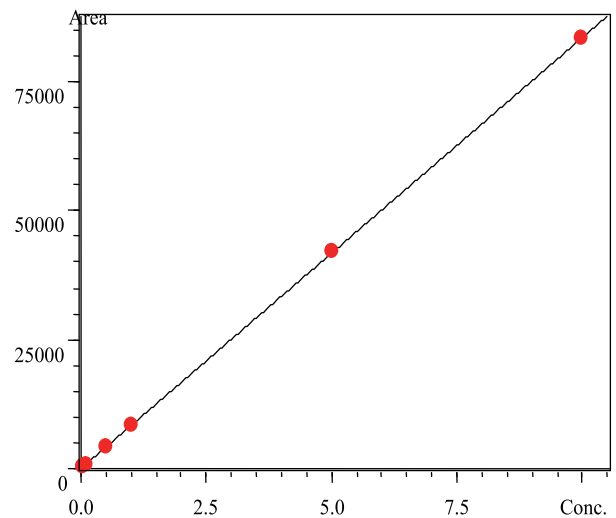


图8 HD-M的标准工作曲线

表3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 r
1	HD	$Y = (7175.77)X$	0.05-50	0.9998
2	HD-M	$Y = (8349)X$	0.1-10	0.9999

2.3精密度实验

表4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD% (0.5 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (5 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (50 $\mu\text{g/L}$)	
	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.
HD	2.490	0.107	0.796	0.123	0.978	0.125
HD-M	2.780	0.182	2.526	0.118	0.403	0.123

对0.5、5、50 $\mu\text{g/L}$ 混合标准工作液连续测定6次, 考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的重复性结果如表4所示。结果显示: 3个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在0.403%~2.780%和0.107%~0.182%之间, 仪器精密度良好。

2.4 灵敏度实验

为了考察仪器的灵敏度，给出低浓度下混标的色谱图。

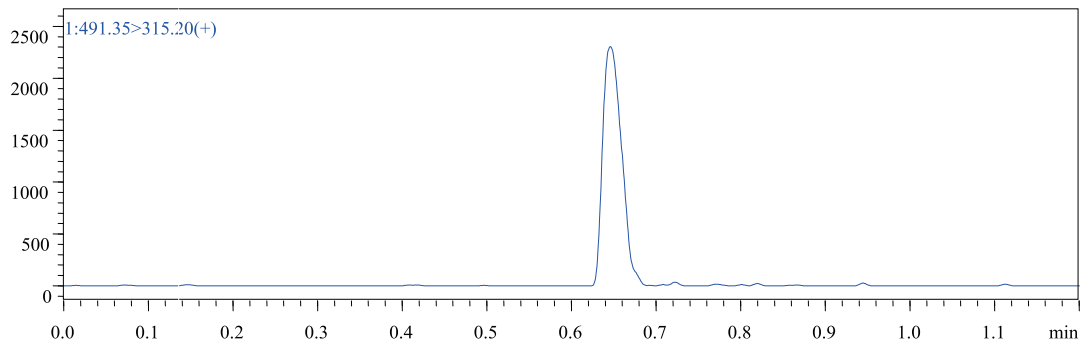


图9 HD MRM模式色谱图(0.05 ng/mL)

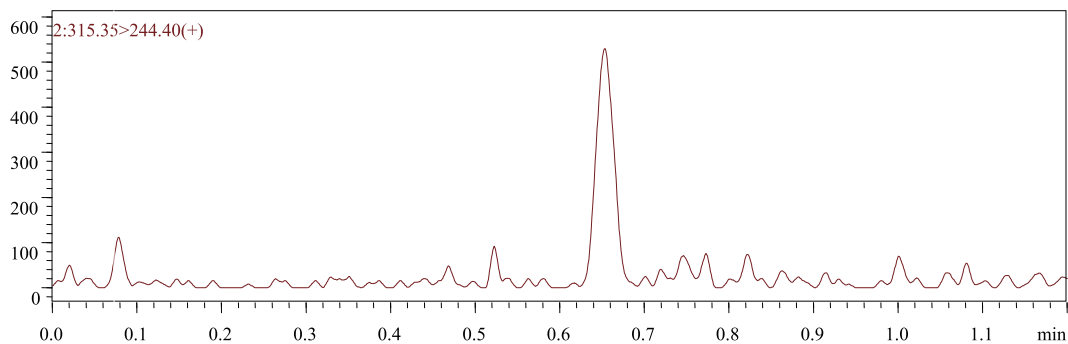


图10 HD-M MRM模式色谱图(0.05 ng/mL)

以ASTM方式计算噪音，以10倍信噪比为定量限，计算得到HD和HD-M的定量限分别为0.005 $\mu\text{g/L}$ 和0.1 $\mu\text{g/L}$ ，见表5。

表5 信噪比测试结果(n=6)和定量限

No.	名称	浓度($\mu\text{g/L}$)	S/N 平均值(n=6)	定量限($\mu\text{g/L}$)
1	HD	0.05	133	0.005
2	HD-M	0.05	6.34	0.1

结论

使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8030联用分析了抗肿瘤新药HD及其代谢物HD-M。该方法分析速度快，精密度良好；校准曲线相关系数均在0.999以上；HD和HD-M的仪器定量限分别为0.005 $\mu\text{g/L}$ 和0.1 $\mu\text{g/L}$ 。