

人血浆中缓激肽的SPE LC-MS/MS定量检测方法开发

Mary E. Lame、Erin E. Chambers和Kenneth J. Fountain
沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德）

应用优势

- 使用CORTECS™ UPLC®色谱柱有利于获得较窄的峰宽、改善灵敏度和分离度，并消除基质干扰
- 采用Oasis® WCX（一种混合型吸附剂）的SPE方法降低了基质干扰并提高了血浆中缓激肽提取的选择性
- Oasis μElution 96孔板可浓缩样品，并在最大程度上减少肽损失，使血浆中缓激肽的检测限达到5 pg/mL
- 选择性高的快速SPE提取（<30 分钟）省去了耗时的免疫亲和纯化步骤
- Xevo® TQ-S MS可实现与免疫检测方法相匹配的高灵敏度，但与后者相比更加省时省力
- 与传统LBA方法相比更为准确精密
- 分析速度快，只需3.5分钟，大大提高了工作效率

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC®系统

Xevo TQ-S质谱仪

CORTECS UPLC C₁₈色谱柱

Oasis WCX 96孔μElution提取板

ACQUITY® 96孔收集板

关键词

生物分析，Oasis，样品制备，肽定量，缓激肽，UPLC，CORTECS，血浆

简介

缓激肽是一种含有9种氨基酸的生理和药理活性肽，由蛋白质的激肽基团衍生而来（图1）。激肽是可以促使血管舒张、血管通透性增强、一氧化氮释放和花生四烯酸流动的效应因子。它是血压、肾功能和心脏功能的重要调节因子，还参与炎症反应¹。缓激肽可引起血管扩张，从而导致血压降低。因此，对这种激素肽的变化进行高灵敏度、高选择性和高准确度地定量，并将其作为疾病进展或药物治疗的评估指标，将会极为有利。尽管以往都是通过配体结合试验（LBAs）对生物制剂进行定量分析，但在过去几年中利用LC-MS/MS分析大分子已成为一种趋势。这在某种程度上是因为LBAs产生显著的交叉反应问题并且缺乏标准化。LC-MS/MS具有多种优势，例如开发时间更短、准确度和精度更高、可重复进样，并且容易区分相似度很高的类似物、代谢物或内源性干扰物。常见的肽通常难以通过LC-MS/MS进行分析，这是因为其不易离子化以及不易产生理想的碎片离子而导致MS灵敏度较低，从而使得LC和样品制备方法开发非常困难。由于缓激肽在血浆中的浓度低至pg/mL水平且代谢速度快，在采血和样品制备过程中还可通过蛋白水解人为生成，因此对其进行准确定量相当困难。

本研究采用了专门设计的血液收集技术以防止体外缓激肽的形成，并且利用混合型固相萃取（SPE）和高效实心核颗粒色谱柱，最大限度降低并消除基质干扰的同时提高定量分析的灵敏度。

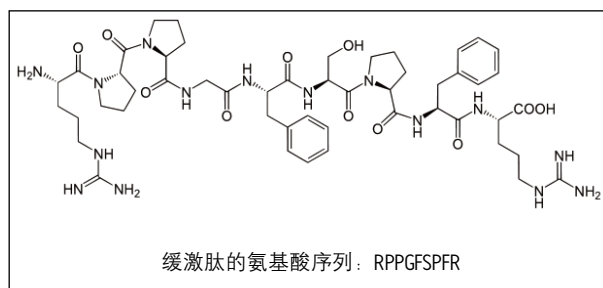


图1. 缓激肽的典型结构和氨基酸序列。

实验

方法条件

系统:	ACQUITY UPLC
色谱柱:	CORTECS UPLC C ₁₈ 1.6 μm, 2.1 × 50mm
流动相A:	0.1%甲酸 水溶液
流动相B:	0.1%甲酸 乙腈溶液
梯度:	见表1
柱温:	35 °C
样品温度:	15 °C
进样体积:	10 μL
总运行时间:	3.5 min
收集板:	Waters 1 mL ACQUITY 收集板

MS条件

MS系统:	Xevo TQ-S
电离模式:	ESI+
毛细管电压:	3.0 kV
脱溶剂气温度:	500 °C
锥孔气流速:	150 L/h
脱溶剂气流速:	1000 L/h
碰撞室压力:	3.58 × 10 ⁻³ mbar
碰撞能量:	按组分优化, 见表2
锥孔电压:	按组分优化, 见表2

数据管理

色谱软件:	UNIFI® 1.6
定量软件:	UNIFI 1.6

样品制备

样品预处理

将10 μL内标 (IS) 赖氨酸 - (脱-精氨酸9) - 缓激肽 (10 ng/mL) 加入200 μL人血浆中并混合。然后使用5% NH₄OH水溶液对样品进行1:1稀释并混合。

使用Oasis WCX提取样品

根据图2所示方案提取预处理的血浆样品。所有溶液按体积计。对μElution板上放置样品的孔实施全部提取步骤。

Oasis WCX μElution 方案 部件号: 186002499
活化: 200 μL MeOH
平衡: 200 μL 5% NH ₄ OH 水溶液
上样: 400 μL 预处理血浆
清洗1: 200 μL 5% NH ₄ OH 水溶液
清洗2: 200 μL 10% ACN 水溶液
洗脱: 2 × 25 μL of 1% TFA 的 75:25 ACN:H ₂ O溶液
稀释: 50 μL 水

图2. Oasis μElution WCX提取方案。

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)	曲线
0.00	0.400	95.0	5.0	初始
0.15	0.400	95.0	5.0	6
1.75	0.400	25.0	75.0	6
2.00	0.400	5.0	95.0	6
2.50	0.400	5.0	95.0	6
2.60	0.400	95.0	5.0	6
3.00	0.400	95.0	5.0	6

表1. UPLC梯度条件。

结果与讨论

质谱分析

在 m/z 531和 m/z 354观察到缓激肽的2+和3+母离子。缓激肽（图A）和IS（图B）的3+母离子的典型MS/MS谱图如图3所示。在方法开发过程中，记录了一些不同的多电荷母离子和碎片离子。最终使用了缓激肽和IS的3+母离子，因为它们在基质中强度最高且选择性最佳。选择 m/z 419.18 y31+的碎片离子作为缓激肽定量分析的主要碎片离子。选取3+母离子和 m/z 408.18 b41+碎片离子用于确证。对于IS，选择了 m/z 344.94的3+母离子和 m/z 386.03 b72+碎片离子。最佳MS条件如图2所示。尽管许多肽可以生成小于 m/z 200的较强碎片离子，但在提取样品中这些离子（通常为亚胺离子）由于缺乏特异性，会导致高背景噪音。在此检测中，采用 m/z 值大于其母离子的高特异性b或y碎片离子显著提高了特异性，便于使用更为简单的LC和SPE方法。

化合物	母离子	MRM通道	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)	产物离子类型
缓激肽	[M+3H]3+	354.18 > 419.18	28	8	[1H+] 1/y3
	[M+3H]3+	354.18 > 408.18	25	10	[1H+] 1/b4
赖氨酸-(脱-精氨酸9)-舒爱激肽(IS)	[M+3H]3+	344.94 > 386.03	28	10	[2H+] 1/b7

表2. 缓激肽和内标 (IS) 赖氨酸-(脱-精氨酸9)-缓激肽的MRM通道、碰撞能量和锥孔电压。

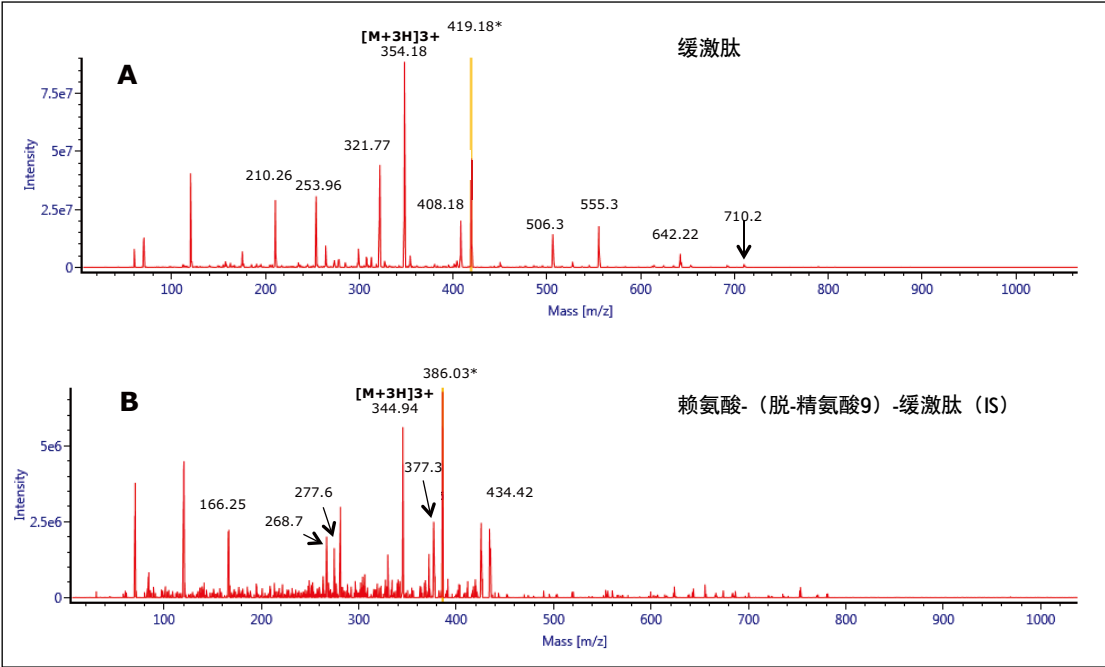


图3. 缓激肽 (A) 和赖氨酸-(脱-精氨酸9)-缓激肽 (B) 的3+母离子的MS/MS谱图。选择用于定量的MRM通道以星号 (*) 示出。

UPLC分离

与小分子不同，肽在全多孔颗粒中的传质性能较差。因此，在生物分析研究常用的较高流速下，使用实心核颗粒填充的色谱柱可获得更清晰的峰形^{2,3}。与全多孔颗粒色谱柱相比，在使用CORTECS UPLC C₁₈色谱柱时，缓激肽所得到的峰宽更窄、拖尾现象减少、峰高和峰面积更大。利用CORTECS UPLC C₁₈色谱柱得到的缓激肽和IS的峰宽为2.5-3.0秒，而在全多孔色谱柱中峰宽为4秒。使用CORTECS UPLC C₁₈色谱柱得到的缓激肽和IS的典型色谱图如图4所示。

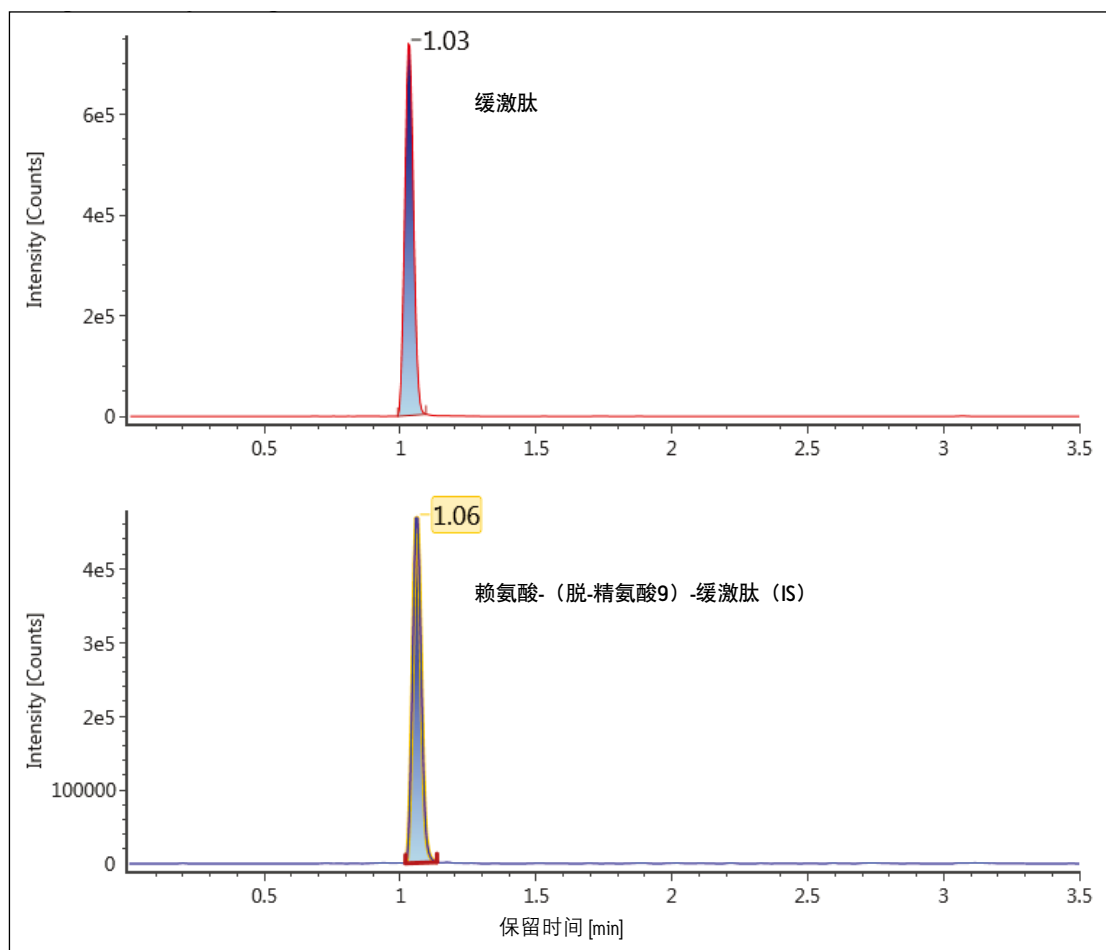


图4. 使用 2.1×50 mm CORTECS UPLC C₁₈色谱柱时空白提取血浆中缓激肽和内标的UPLC分离。

样品制备

将人血浆收集到含有EDTA和蛋白酶抑制剂的试管中，以防止体外形成缓激肽。使用Oasis WCX（一种混合型吸附剂）进行SPE提取，提高提取的选择性。此吸附剂依靠反相和离子交换保留机制将复杂血浆样品中的缓激肽与其它高丰度多肽选择性地分离开来。Oasis μ Elution 96孔提取板可在无需蒸发和复溶的条件下富集样品。这不仅节省了时间，还减少了由于蒸发过程中收集板壁的吸附而导致的肽损失。预处理和清洗步骤的优化对于在样品预处理和SPE提取中完全回收缓激肽至关重要。使用酸或碱对样品进行预处理可降低粘度并增加与吸附剂的接触时间，有利于抑制蛋白质结合，还可以通过离子交换功能使肽在SPE设备中得到更好的保留。在最初的方法开发中，通过用酸预处理血浆获得了约80%的回收率。由于缓激肽是一种碱性的极性肽，其PI值为12.0，HPLC指数为47.8，因此怀疑它在最初的上样步骤中发生了部分洗脱。当使用碱进行预处理时，回收率增加至约90%，这有利于在上样步骤中通过离子交换改善缓激肽的初始保留性能。将清洗步骤2中的乙腈溶液由20%变为10%，消除了清洗过程中缓激肽的穿透现象，并使回收率提升至100%。在上样前对血浆进行碱预处理的优化SPE方案与采用10%乙腈溶液的优化清洗步骤相结合，实现了缓激肽的完全回收，且基质效应小于10%。此外，由于UPLC分离在反相色谱进行，因此利用离子交换实现的肽分离为整个方法赋予了正交性。

线性、准确度和精度

为了生成标准曲线，用以下最终浓度的缓激肽对人血浆进行强化：5、20、30、60、100、200、400、600、1000、2000、6000和10000 pg/mL。在人血浆中制备以下浓度的质量控制（QC）样品：25、80、250、800和5000 pg/mL。使用赖氨酸-（脱-精氨酸9）-缓激肽（最终浓度为0.5 ng/mL）作为缓激肽的内标（IS）。计算分析物峰面积与IS峰之间的峰面积比（PAR）。使用校准样品的PAR并应用单一浓度（1/x）加权线性回归模型构建人血浆样品的校准曲线。然后根据校准曲线，通过PAR值计算出所有QC样品的浓度。由于存在内源性缓激肽，因此采用标准品加入法。通过计算x轴截距确定对照血浆样品中缓激肽的平均基底浓度。然后，将缓激肽的基底浓度加入到所有标曲浓度和QC浓度，以实现准确定量。使用1/x回归，缓激肽所得曲线呈线性， R^2 值>0.99。表3所示为标准曲线性能汇总。QC分析结果示于表4中，内源性缓激肽和QC的典型色谱图如图5所示。所有浓度的QC样品都表现出极好的准确度和精密度，满足了有关LC-MS/MS检测的生物分析方法验证最佳实践白皮书中建议的FDA可接受标准^{4,5}。人血浆中缓激肽的平均内源性基底浓度测得为79 pg/mL，SD和CV%分别为4.4和5.5。以上数据证实了这是一种稳定且可重现的方法。

缓激肽 加标 浓度 (pg/mL)	缓激肽 浓度 (pg/mL)	峰面积	IS峰面积	响应	计算所得 的缓激肽 浓度 (pg/mL)	平均 准确度
0	75.0	120000	991500	0.12	74.5	—
5	80.0	138928	931348	0.15	82.0	102.6
20	95.0	152184	941220	0.16	91.0	95.7
30	105.0	173525	1013404	0.17	97.5	93.1
40	115.0	189983	1056286	0.18	104.0	90.3
60	125.0	224125	1031234	0.22	130.0	104.2
100	175.0	292295	1022053	0.29	179.0	102.3
200	275.0	423025	992847	0.43	277.5	100.9
400	487.5	713385	991162	0.72	485.0	102.1
600	675.0	1098315	1030669	1.07	731.0	108.3
1000	1075.0	1710600	1037196	1.65	1140.5	106.1
2000	2075.0	3186097	1038521	3.08	2146.5	103.5
6000	6075.0	9407254	1118181	8.41	5913.5	97.3
10000	10075.0	14889560	1050281	14.18	9982.5	99.1

表3. 从人血浆中提取的缓激肽在5-10000 pg/mL范围内的标准曲线汇总和统计。

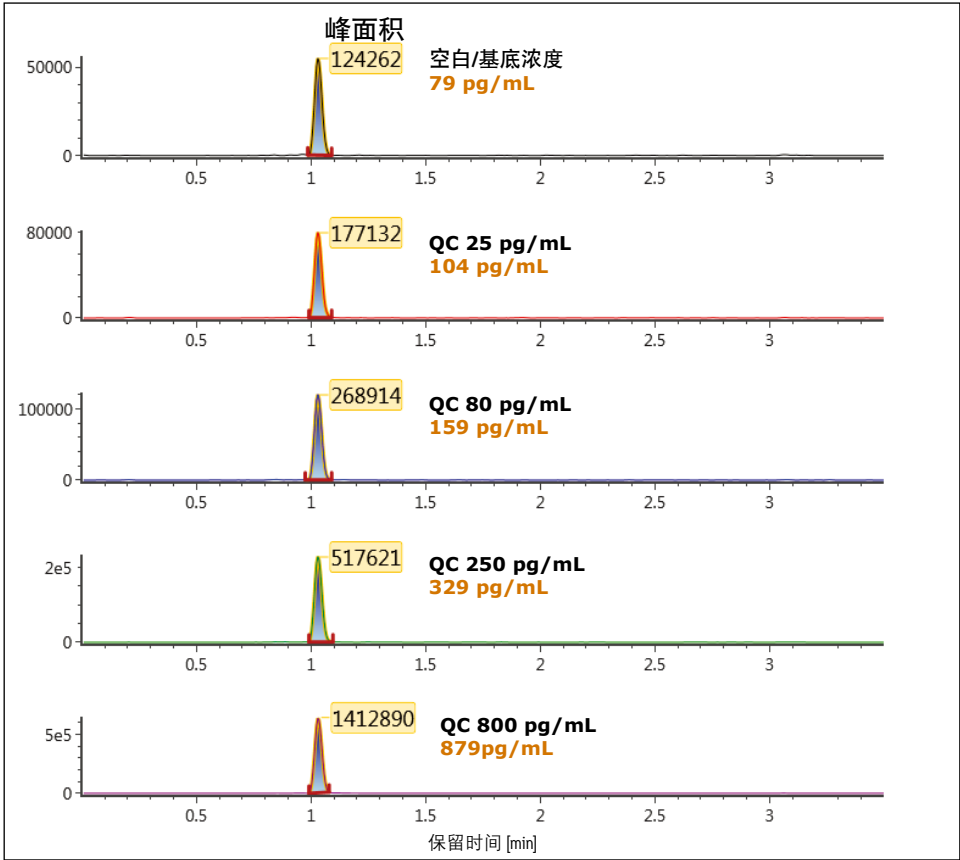


图5. 与提取的空白血浆相比，人血浆中QC浓度为25、80、250和800 pg/mL的缓激肽的典型色谱图。

缓激肽 加标浓度 (pg/mL)	缓激肽 QC浓度 (pg/mL)	平均 (N=4) 计算浓度 (pg/mL)	SD	CV%	平均 准确度
0	79	78.7	4.4	5.5	—
25	104	111.3	1.9	1.7	106.8
80	159	167.3	5.7	3.4	105.1
250	329	332.3	3.1	0.9	99.1
800	879	930.5	7.6	0.8	105.9
5000	5079	5069.8	25.2	0.5	99.8

表4. 从人血浆中提取的缓激肽的QC统计。

预分析收集和处理的的重要性

对血浆中的缓激肽进行准确定量十分困难，因为缓激肽可以在采血和样品制备中经蛋白水解过程而生成^{1,6,7}。本研究特别注重血液收集方案，通过添加蛋白酶抑制剂以防止体外缓激肽的形成。在图6中，A图和B图显示出，如果采用同一供体和相同的收集方案，将血液收集到分别添加和未添加蛋白酶抑制剂的EDTA试管中，缓激肽的浓度从90 pg/mL升至250 pg/mL。通过使用来自供应商的另外两个供体的未指定样品收集方案，缓激肽的人为形成得到进一步证实，如图6（图C和图D）所示。在上述情况下，将血液样品收集到不含蛋白酶抑制剂的EDTA试管中，浓度达到了较高的ng/mL水平。这些结果进一步证明了合适的样品收集方式对于准确定量内源性缓激肽血浆浓度的必要性。

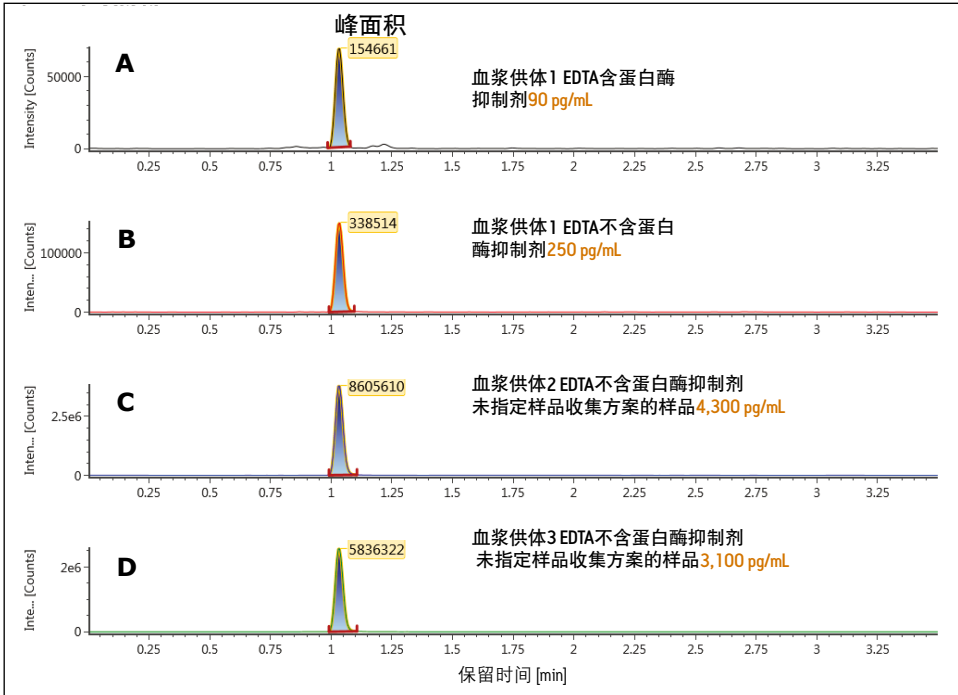


图6. 在添加和不添加蛋白酶抑制剂的情况下，来自多个供体的不同内源性浓度人血浆提取缓激肽的典型色谱图。

结论

本研究开发了一种用于提取人血浆中缓激肽的混合模式SPE提取方法。 μ Elution SPE提取板消除了蒸发操作需求,并且利用非特异性结合和样品浓缩而大大降低了损失的可能性。通过一种快速、简单、分析级的LC方法将缓激肽与相似度很高的内源性干扰物分离开来, LC总运行时间仅为3.5分钟。与传统的 C_{18} 全多孔色谱柱相比, CORTECS UPLC C_{18} 实心核颗粒色谱柱改善了峰形, 提高了缓激肽检测的灵敏度。CORTECS UPLC C_{18} 色谱柱、混合型弱阳离子交换SPE以及 m/z 较高的b或y MS碎片离子的联合使用提供了理想的选择性和灵敏度水平, 从而实现了准确定量并从200 μ L血浆中区分缓激肽浓度细微差异。标准曲线在5-10000 pg/mL的范围内准确精密。在高于基底浓度的情况下可精确定量的缓激肽最低浓度为5 pg/mL。所有浓度的QC样品均符合FDA法规标准^{4,5}, 平均准确度范围为99.8-106.8, 平均CV%为0.5-5.5。以上数据证实了这是一种准确且可重现的方法。本研究还证实了采用合适的蛋白酶抑制剂样品收集方式对于准确测定缓激肽内源性浓度的重要性。此外, 如果需要执行进一步验证, 本方法在通过LC-MS/MS对PK和临床研究的患者样品进行高灵敏度的缓激肽定量方面也表现出巨大的潜力。

参考文献

1. Murphey LJ, Hachey DL, JA. Oates JA, Morrow JD, and Brown NJ. Metabolism of Bradykinin In Vivo in Humans: Identification of BK1-5 as a Stable Plasma Peptide Metabolite J Pharmacol Exp Ther July 1, 2000 294:263-269
2. Wagner BM, Schuster SA, Boyes BE, Kirkland JJ. Superficially porous silica particles with wide pores for biomacromolecular separations. Journal of Chromatography A. 2012; 1264(0): 22-30
3. Kirkland JJ, Schuster SA, Johnson WL, boyes BE. Fused-Core Particle Technology in High-Performance Liquid Chromatography; An Overview. Journal of Pharmaceutical Analysis.
4. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, Shah VP, Skelly JP, Swann PG, Weiner R, Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays, Pharm. Res., 24 (2007) 1962-1973.
5. Bansal S, DeStefano A, Key elements of bioanalytical method validation for small molecules, AAPS J., 9 (2007) E109-114.
6. Cugno M, Agostoni P, Brunner HR, Gardinali M, Agostoni A, Nussberger. Plasma bradykinin levels in human chronic congestive heart failure J. Clin Sci. (Lond). 2000 Nov; 99(5):461-6.
7. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. Lancet. 1998 Jun 6; 351(9117):1693-7.

致谢

感谢Jeffrey Widdos和Biological Specialty Corporation为本研究所用人血浆的收集提供的服务和协助。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®



Waters, ACQUITY UPLC, ACQUITY, Oasis, UNIFI, Xevo 和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。CORTECS 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。

©2013 年沃特世公司。印制于中国
2013年11月 720004833ZH 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 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