

使用复合模式固相萃取技术去除血浆样品中的聚乙二醇400 (PEG 400)

Jonathan P. Danaceau, Erin Chambers, and Kenneth J. Fountain

沃特世公司，美国马萨诸塞州米尔福德

应用优势

- 去除血浆中的PEG 400
- 去除PEG 400的离子抑制作用
- 只需快速、简单的样品前处理方法即可实现净化目的

沃特世解决方案

Oasis® MCX 96孔板

ACQUITY UPLC® BEH C₁₈柱

关键词

赋形剂去除，PEG去除，SPE，LC/MS，ESI，离子抑制，基质效应

引言

PEG 400等药物赋形剂通常被加入到制剂中以促进其在介质中溶解。然而，这些化合物却可引发显著的基质效应，尤其是在LC/MS/MS分析中产生的离子抑制效应。常规药物研发流程中使用的快速LC梯度方法，容易导致此类化合物和目标分析物的共流出。由于这种共流出物已被证实是导致离子抑制效应的主要原因，因此在早期药代动力学（PK）研究中，赋形剂浓度偏高可能会带来棘手的问题¹⁻³。为尽量减少这一问题引发的不良影响，目前已研究出的方法包括：LC梯度调节^{2,3}，分析色谱柱的选择¹，样品制备策略的方法开发¹⁻³，样品稀释⁵，甚至是全新制剂药的开发⁴。即便其中部分方法已取得成效，他们也存在各自的局限性。很显然，分析员通常无法自己选择制剂药赋形剂。无论是改变梯度或流动相，还是色谱柱的选择，LC条件的优化都能够针对部分分析物解决这一问题，但它既无法应用到全部分析物，也需要更多的方法开发作为辅助支持。同时，对LC运行条件的过多优化并不利于高通量分析。有研究人员指出，“若能开发出一种更优化的固相萃取（SPE）方法，便可实现有效的净化效果。”³

针对以上问题，本应用纪要通过使用Oasis复合模式阳离子交换（MCX）SPE方法提供了一种可以快速、便捷、高效的解决方案。碱性分析物通过强阳离子交换作用被吸附在填料中，而如PEG等非离子型的赋形剂则通过反相机理被吸附，同时能够在分析物洗脱之前被选择性去除。

实验

样品制备

标准品包含：醋丁洛尔、美托洛尔、拉贝洛尔、咪达唑仑。这些成分分别加入到空白血浆中、调整其浓度至200 ng/mL，或是后加标到萃取后的空白血浆洗脱液中，用于回收率的计算。PEG400也是分别加入到空白血浆中调整其浓度到5 mg/mL或者后加标到萃取后的空白血浆洗脱液中用于确定回收率。

样品按照Oasis® MCX的标准操作流程进行萃取。简单来说，在0.5 mL血浆中加入0.5 mL 4% H₃PO₄进行酸化。（注意：本研究中采用的是0.5 mL血浆，采用更小剂量亦可）。MCX96孔板在经过1.0 mL MeOH和1.0 mL H₂O活化平衡之后，经酸化的样品被上样到填料中。上样后，使用1.0 mL 2%甲酸和2 × 1.0 mL MeOH清洗。样品使用2 × 250 µL含5% NH₄OH的MeOH溶液进行洗脱。“后加标”（PS）样品是在空白血浆洗脱液中加入标准品或标准品与PEG 400的混合物。经萃取的样品则以以下方式制备：在未经萃取的血浆中加入200 ng/mL标准品、或在其基础上再加入5 mg/mL PEG 400。

PEG去除的回收率依据以下算式得出：

$$\% \text{ 回收率} = (\text{萃取样品峰面积} / \text{后加标样品峰面积}) \times 100\%$$

为进行PEG去除的相关分析，样品按照1:200的比例在流动相中进行稀释，以避免高浓度PEG 400给质谱仪带来的污染。

方法条件

SPE条件

SPE板：Oasis MCX 96孔板30 µm (30 mg)，
部件编号：186000248

液相色谱条件

液相色谱系统：沃特世ACQUITY UPLC系统
检测：沃特世ACQUITY® SQD
样品瓶：2 mL 96孔收集板；部件号 WAT058958
色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 1.7 µm, 2.1 x 50 mm, 部件号：186002350
柱温：30 °C
样品温度：10 °C
进样量：10 µL
流速：0.5 mL/min.
流动相A (MPA)：0.1% HCOOH水
流动相B (MPB)：0.1% HCOOH乙腈

初始流动相条件为95:5 MPA:MPB。持续0.5分钟，MPB在2.5分钟之后增至90%。MPB比例随后降回5%，并持续2分钟，重新平衡色谱柱。总运行时间5.0分钟。

质谱条件

质谱系统：沃特世ACQUITY SQD
电离模式：(+) ESI
采集范围：SIR
毛细管电压：2.5 kV
锥孔电压：根据化合物有所区别（针对不同分析物进行优化）
脱溶剂气体：700 L/min
锥孔气：0 L/min

数据管理

色谱系统：MassLynx® V4.1 SCN714和MS软件

结果与讨论

PEG 400及其他四种测试化合物的色谱图如图1所示。图中宽峰是PEG 400丰度较大的分子离子峰的综合TIC，包括以下分子量的PEG单峰：370、414、458、502、546、590和634。标准品（醋丁洛尔、美托洛尔、拉贝洛尔、咪达挫仑）可通过MH⁺离子的SIR显示，除咪达挫仑，它的MH⁺离子与（MH-35）⁺离子合并成一个峰。值得注意的是，醋丁洛尔和美托洛尔均与PEG发生共流出，因而二者更容易受到血浆样品中残留PEG产生的离子抑制的影响。图2为PEG的两个色谱图。A图显示未经过SPE处理的血浆样品中PEG含量情况。它是将PEG后加标至萃取的最终血浆洗脱液中得到。B图则为含有5 mg/mL PEG的血浆样品经标准MCX流程萃取得到的，该图表明血浆样品中几乎全部PEG 400都得以去除。图3显示为实验所用样品组的平均PEG峰面积，如图所示，采用MCX萃取，超过99%的PEG 400得以去除。

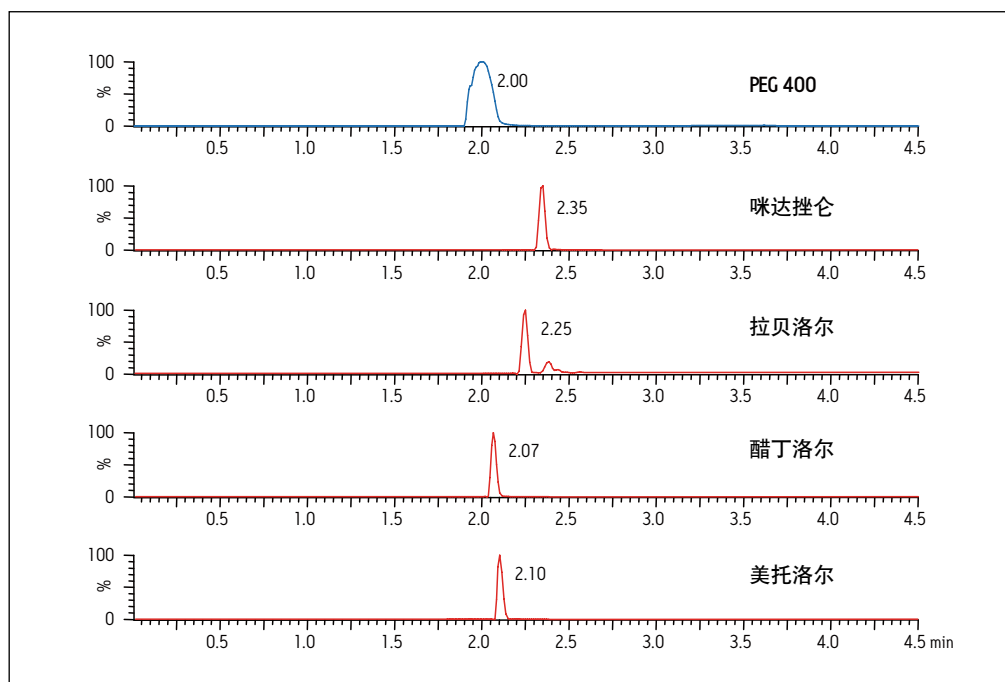


图1. PEG 400及标准品色谱图

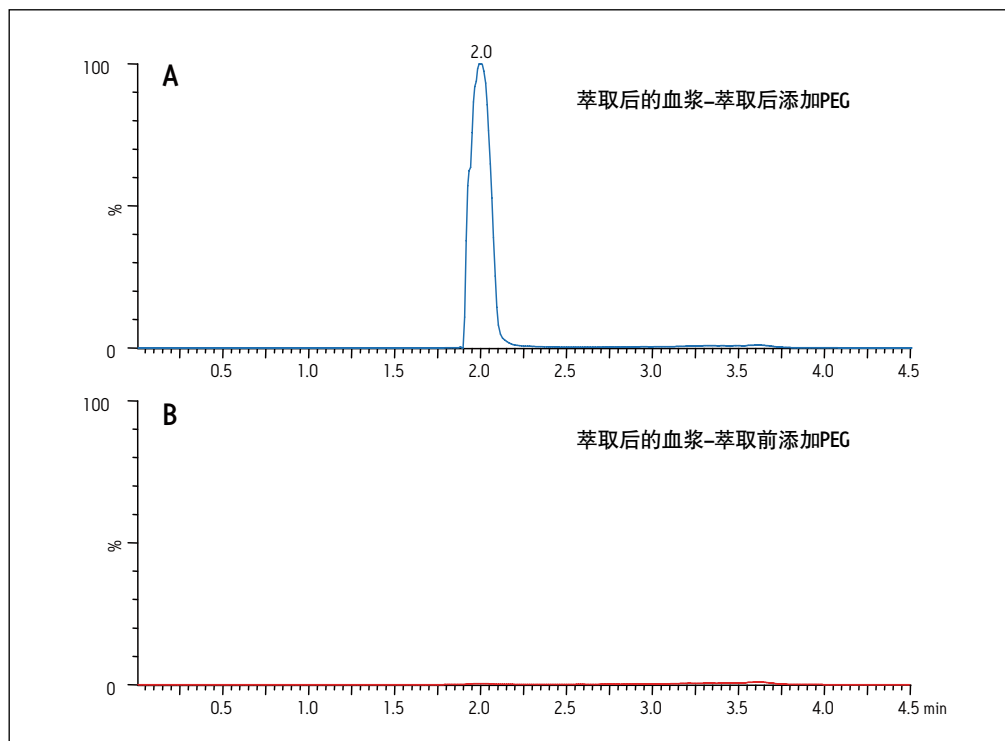


图2. 5 mg/mL PEG 400-后加标色谱图和加标样品萃取色谱图

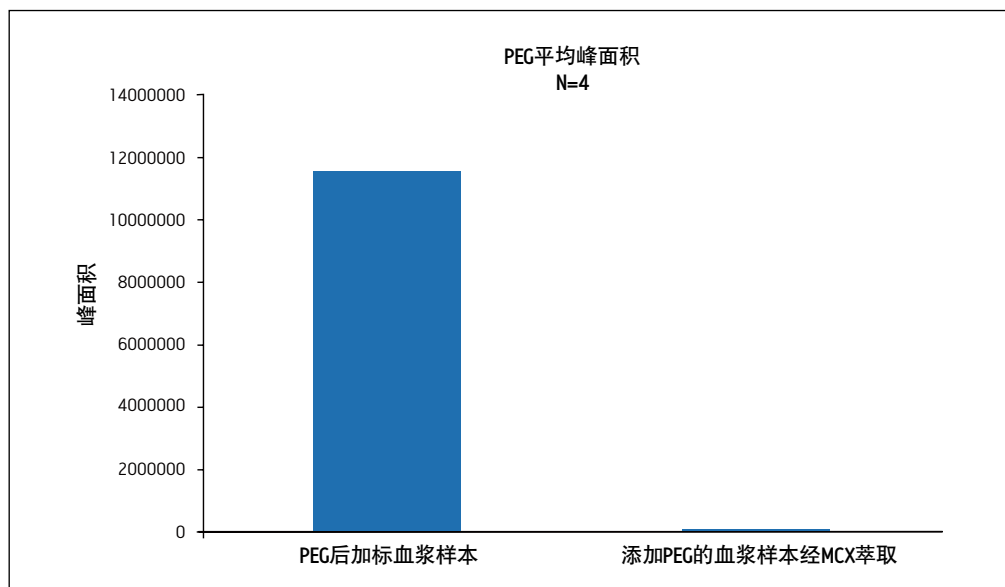


图3. 使用MCX从血浆中去除PEG

按照前文方法的方程式计算分析物回收率。如图4A所示，采用标准MCX流程后，每种分析物的回收率都超过80%。而对这四种分析物而言，平均回收率则达到95%。如图4B所示，血浆中含有的5 mg/mL PEG 400对于分析物回收率并无影响。在含有PEG的情况下，平均回收率为103.6%。

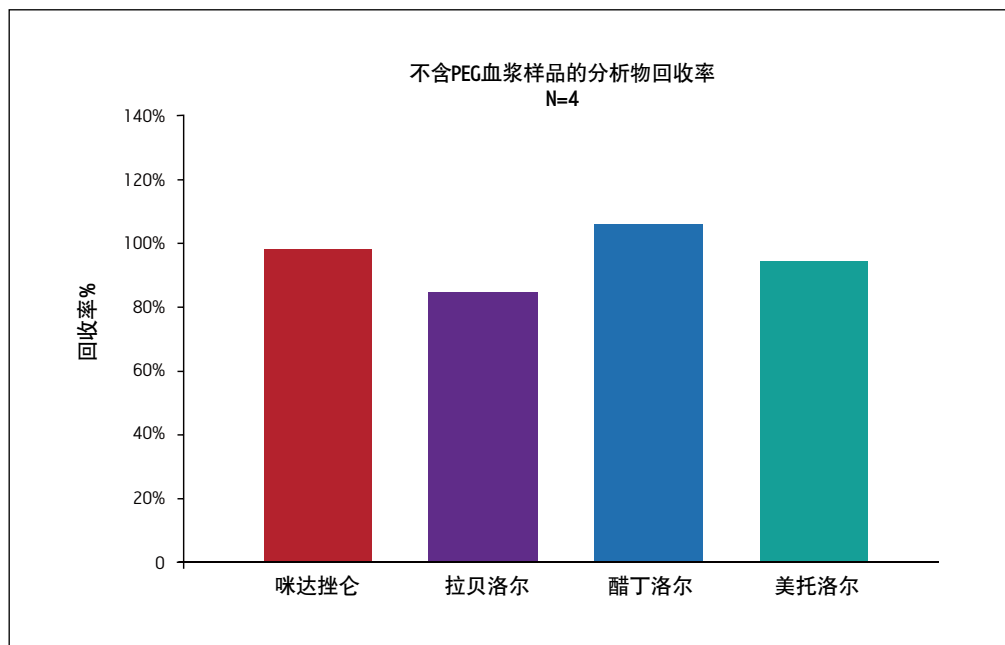


图4A. 血浆样品中的分析物回收率

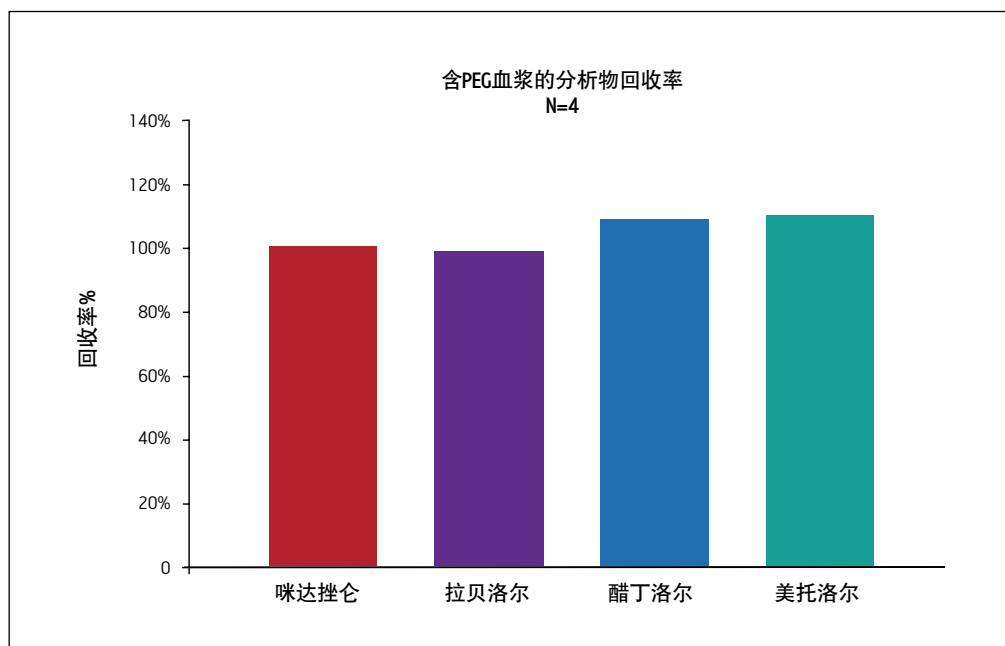


图4B. 含PEG血浆样品的分析物回收率

将PEG 400从血浆中去掉的主要目的是为了清除可能引发的离子抑制效应。图5为由下面方程式得出的基质效应数据一览，据最新AAPS论文报道⁶。

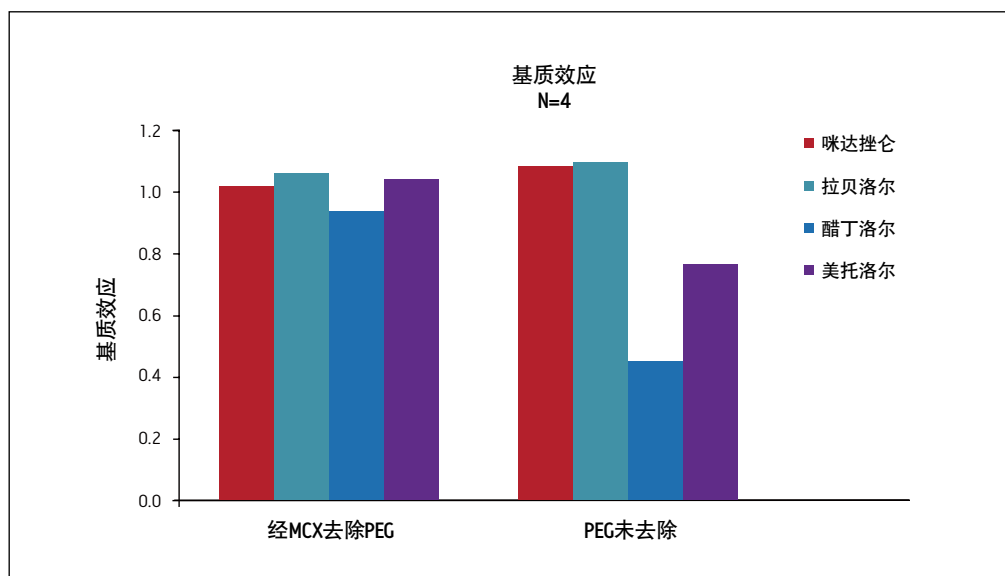


图5. 萃取样品中的基质效应 (MF)

基质效应 = (含PEG的峰响应值/不含PEG的峰响应值)

图表A所示数据来源于经Oasis MCX萃取去除PEG的血浆样品。图表B所示数据来源于经萃取后又加入PEG的血浆样品，可以看到在样品制备过程中未去除PEG的结果。由图显示，若未去除PEG，醋丁洛尔和美托洛尔受到严重的离子抑制作用影响，基质效应因子分别为0.45和0.77。由上述数据可以清晰看出，那些与PEG峰共流出的分析物，使用Oasis MCX SPE板去除PEG后，离子抑制效应能得以有效清除。经PEG去除后，最终醋丁洛尔和美托洛尔的基质效应因子分别为0.93和1.04。

结论

Oasis MCX 96孔板提供了一种用于去除血浆样品中高浓度PEG的简便、快捷、高效的方法，从而消除早期药代动力学研究中常见的基质效应（通常是离子抑制效应）。此外，该解决方案无需进行色谱分析方法的再开发、样品的稀释、及其他费时费力的流程即可成功解决上述问题，这使得整个解决方案广泛适用于高通量分析的应用。

参考文献

1. Tong X, Wang J, Zheng S, Pivnichny J, Griffin P, Shen X, Donnelly M, Vakerich K, Nunes C, and Fenyk-Melody J. Effect of signal interference from dosing excipients on pharmacokinetic screening of drug candidates by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 2002 **74**:6305-6313.
2. Weaver R and Riley R. Identification and reduction of ion suppression effects on pharmacokinetic parameters by polyethylene glycol 400. *Rapid Comm Mass Spec* 2006 **20**:2559-2564.
3. Shou W and Naidong W. Post-column infusion study of the 'dosing vehicle effect' in the liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of discovery pharmacokinetic samples. *Rapid Comm. Mass Spec* 2003 **17**:589-597.
4. Temesi D, Law B, and Howe N. Synthesis and evaluation of PEG414, a novel formulating agent that avoids analytical problems associated with polydisperse vehicles such as PEG400. *J. Pharmaceutical Sciences* 2003 **92**(12):2512-2518.
5. Larger P, Breda M, Fraier D, Hughes H, and James C. Ion-suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry due to a formulation agent, a case study in drug discovery bioanalysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005 **39**:206-216.
6. Bansal S and DeStefano A. Key elements of bioanalytical method development validation for small molecules. *The AAPS Journal* 2007 **9**(1):E109-E114.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、Oasis、ACQUITY UPLC、ACQUITY和MassLynx是沃特世公司的注册商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。



©2011 年沃特世公司。印制于中国
2011年10月 720004127ZHS-PDF

沃特世中国有限公司
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