

对ionKey/MS系统应用于液体生物基质样品中药物分析稳定性进行研究

Paul D. Rainville and Catalin Doneanu
Waters Corporation, Milford, MA, USA

应用优势

通过对常规生物样品前处理方式处理过的复杂样品进行检测，证明ionKey/MS™系统分析稳定性良好。

沃特世解决方案

ionKey/MS系统

ACQUITY UPLC® M-Class

IonKey™离子源

Xevo® TQ-S

iKey™分离装置 BEH C₁₈

MassLynx™

关键词

TQ-S, iKey, ionKey, 生物分析, 稳定性

引言

稳定和可靠的药代动力学（PK）数据是生物分析的重要组成部分。在定量生物分析中，LC-MS是首选的方法，因为该方法可获得较高的选择性和灵敏度。小柱径的色谱柱（如180-300 μm内径）运用到液体生物基质样品分析可追溯到1990s年代后期的Fraser等人，已证明是可增加分析灵敏度和减少DMPK分析所需样品量的方法。但是，应用这种色谱方法也存在一些技术障碍，例如，需专用的仪器、更窄内径的色谱柱、减少连接相关的死体积以便获得最佳的色谱性能。基于生物样品较复杂，小内径色谱元件更易堵塞，实施这种色谱技术可能是一个重大问题。在本文中，我们介绍新型ionKey/MS系统用于血浆样品分析所体现出的良好稳定性，血浆样品采用简单的蛋白沉淀法（PPT）、液液萃取（LLE）、免疫亲和分离配合胰蛋白酶酶解（IA/TD）进行分别制备。

实验条件

UPLC条件

| | |
|-------------|--|
| LC系统: | ACQUITY UPLC M-Class |
| iKey™单元: | iKey BEH PST C ₁₈ 130, 1.7 µm, 150 µm × 50mm |
| iKey温度: | 40 °C |
| 样品温度: | 40 °C |
| 进样体积: | 1 µL |
| 流速: | 4 µL/min |
| 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 (PPT): | 在5分钟内, 5% B至95% B |
| 梯度 (LLE): | 在5分钟内, 5% B至95% B |
| 梯度 (IA/TD): | 在5分钟内, 0% B至30% B |

MS条件

| | |
|----------------------|-----------|
| MS系统: | Xevo TQ-S |
| 离子化: | 阳离子ESI |
| 获取模式: | MRM |
| 毛细管电压: | 3.2 kV |
| 对每种化合物分别优化了锥孔电压和碰撞能量 | |

数据管理

MassLynx 4.1

样品配制

蛋白沉淀法 (PPT)

人血浆以2:1 (乙腈:血浆) 比例加入乙腈中, 涡旋混合一分钟, 随后在5,000相对离心力 (RCF) 下离心5分钟。之后取出上清液, 用移液管转移到LC样品瓶中, 进样到LC-MS系统中。每50次进样插入一针QC样品, 按此规律重复进样, 通过QC样品对色谱性能进行评价, QC样品由右美沙芬和普萘洛尔组成。

液液萃取 (LLE)

人血浆以10:1比例加入己烷, 涡旋混合一分钟, 随后在5,000RCF下离心5分钟。然后, 把上清液转移至一个新的样品瓶中。吹干, 并以初始体积的五分之一进行复溶, 进样于LC-MS系统中。每20次进样插入一针QC样品, 按此规律重复进样, 通过QC样品对色谱性能进行评价, QC样品由右美沙芬和普萘洛尔组成。

单克隆抗体的免疫亲和分离和胰蛋白酶消化 (IA/TD)

样品由百时美施贵宝 (BMS) 公司惠赠。人血浆用治疗性单克隆抗体 (mAb) 加标; 使用免疫亲和磁珠捕获mAb。变性后用胰蛋白酶消化mAb。使用mAb消化产物进样1,000次, 在每次LC-MS运行中监测两种特征肽, 以评价在实验期间的色谱性能。

结果和讨论

生物分析实验室进行的常规分析，通常一个分析批包括2-4个96孔样品板，每块样品板中样品由实验人员采用下述方法进行制备，例如蛋白沉淀法；液液萃取法；或单抗等生物药使用免疫亲和分离及蛋白酶解。在这些方法中，蛋白沉淀法是最常用的，因为在进行小分子分析时，这种方法速度较快且成本较低³。但是，这种前处理技术产生的样品洁净度也是最粗糙的。因此，选用这些最具挑战的生物样品前处理技术对新型150 μm iKey分离装置的稳定性进行实验。ionKey/MS系统由Xevo TQ-S质谱仪、ACQUITY UPLC M-Class、ionKey源和iKey分离装置组成，如图1所示。iKey分离装置以瓷制材料为主题，所有元件集中在一个单元，可直接插入质谱离子源中。



图1. ionKey/MS系统：由Xevo TQ-S、ACQUITY UPLC M-Class、ionKey源和iKey分离装置构成。

图2显示在通用的5分钟LC梯度过程中右美沙芬和普萘洛尔的分离情况。这里，我们观察到右美沙芬和普萘洛尔10%峰高处的峰宽为1秒。在这个峰高时，计算出的分离度是0.8。在图2中，我们看到在使用蛋白沉淀处理过的人血浆样品1 μL 连续进样1000次（5天）后QC标准品的进样情况。值得一提的是，在150 μm 内径iKey上1 μL 进样相当于在传统2.1mm 内径分析柱上200 μL 进样。图2数据比较表明，在实验期间，峰对称性保持的非常好，色谱分离度也维持在0.9。

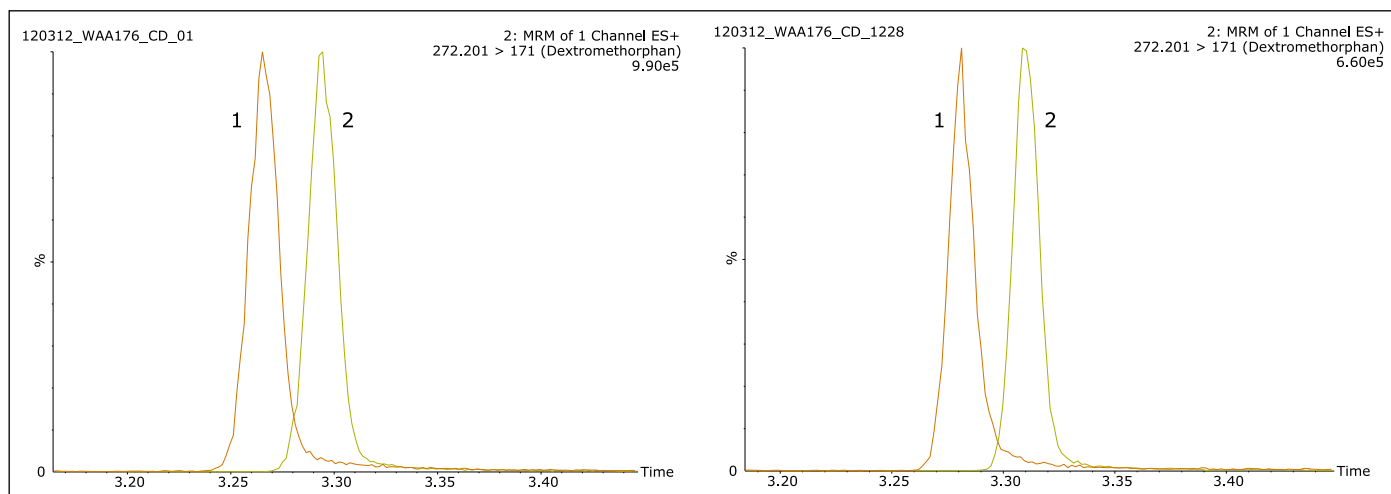


图2. 人血浆蛋白沉淀后，1 μL 连续进样1000次开始和结束时，普萘洛尔 (1) 和右美沙芬 (2) 的分离度比较。

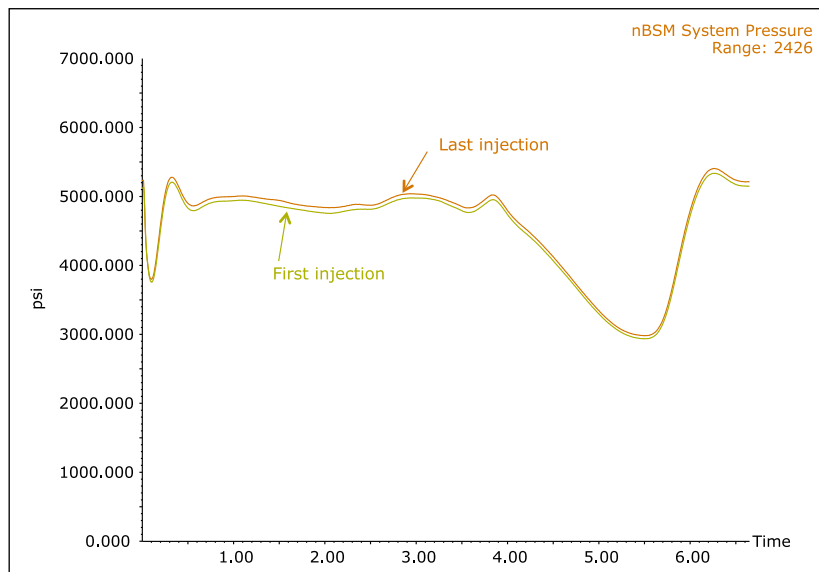


图3. 人血浆样品蛋白沉淀后，1 μL 连续进样，第1针进样和第1000针进样时IonKey/MS系统压力示踪图。

该实验过程中压力示踪图如图3所示。我们观察到系统压力没有明显变化，表明管路或接头都没有在研究过程中堵塞。值得再次一提的是，这个1 μL 进样量，相对于在标准2.1 mm内径柱上200倍的进样体积即200 μL 是类似的。项目研发过程中，质谱源的清洁度常常是持续获得高质量数据的一个关键因素。使用更小体积相当于减少了样品对离子源的污染，但可取得采用标准2.1 mm内径规模LC-MS类似灵敏度结果。

图4显示在蛋白沉淀人血浆样品1000次进样过程中，从QC样品获得峰面积结果。这个数据进一步证明了系统稳定性，这不仅是指iKey分离装置、集成器件和质谱源的耐用性，而是证明了整个系统的稳定性。接下来将使用LLE方法制备的人血浆样本测试系统。这个实验采用与前一样品相同的实验条件。图5显示普萘洛尔和右美沙芬的QC标准品第1次进样和第1000次进样时的情况，证明在整个研究过程中保持了良好的色谱峰形和分离度，基本上与前一个实验结果相似。同时无明显的系统背压变化。

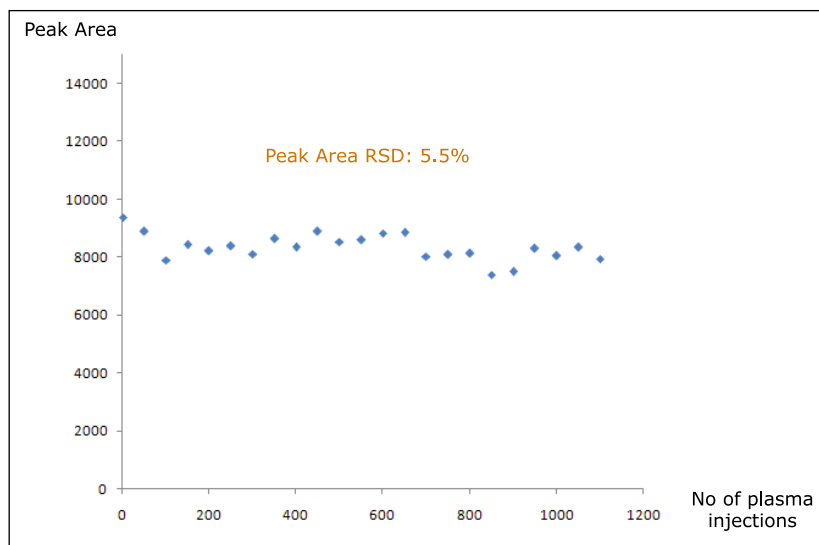


图4. 血浆蛋白沉淀系统稳定性测试过程中，不同时间点QC样品中右美沙芬峰面积示意图。

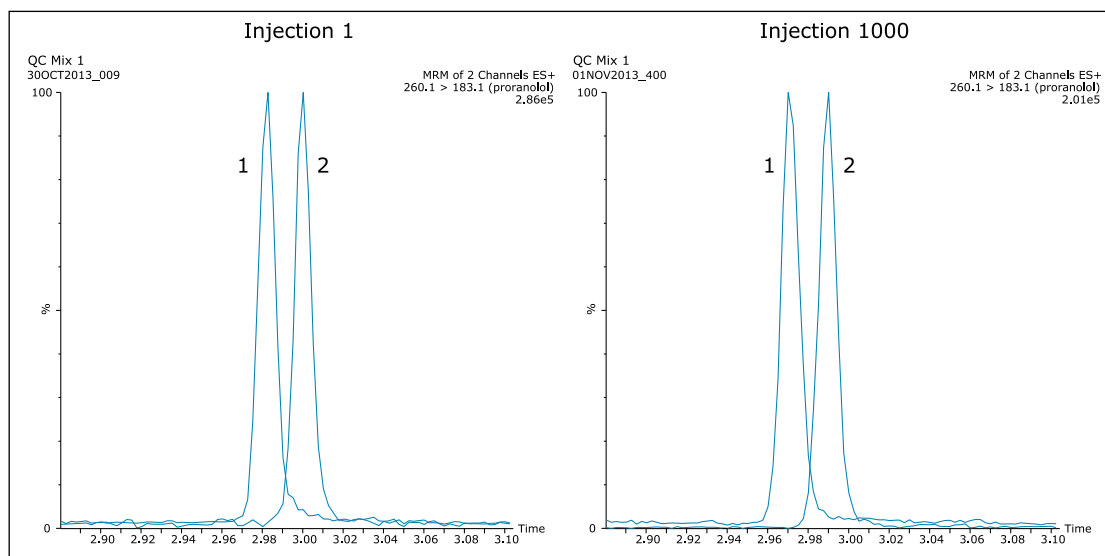


图5. 人血浆经液液萃取后，1 μ L连续进样1000次开始和结束时，普萘洛尔 (1) 和右美沙芬 (2) 的分离度示意图。

由于生物药如抗体药物的研发不断增加，使用常规亲和分离配合酶解，以及使用酶解后的肽段分析测试ionKey/MS系统的稳定性。如上述研究一样，将色谱性能和系统压力作为判断指标。在这个实例中，抗体经胰蛋白酶酶解后产生的特异性肽段用来进行分析。图6显示了实验过程中监测的两种特征肽在第1次进样和在第1000次进样时的峰形。在所采用的实验条件下，观察到的典型肽峰宽（在10%峰高时）是3-4秒。

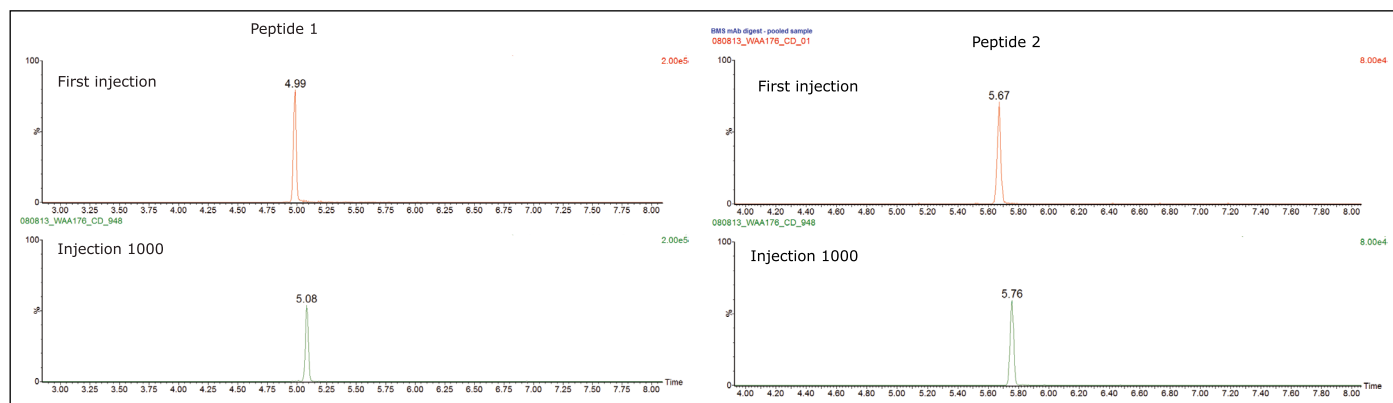


图6. 小鼠血浆中治疗性多肽使用胰酶消化配合免疫亲和分离后两种标志性多肽的MRM图谱。

与上述实验一样，图7展示了研究过程中，开始与最后一针的压力示踪图

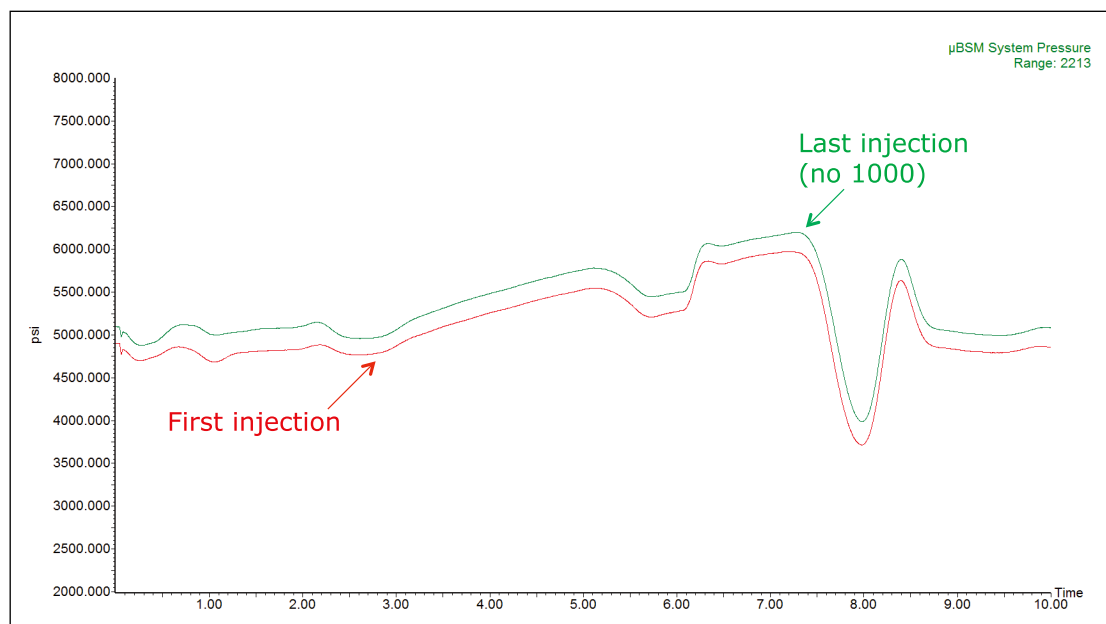


图7. 小鼠血清中mAb经免疫亲和分离配合胰蛋白酶酶解后，第1次和最后一次（第1000次）进样，ionKey/MS系统压力示踪图。

结论

ionKey/MS系统采用了一种新型的150 μm 内径iKey分离装置，改单元使用1.7 μm 色谱颗粒填料进行填充，使得该系统在生物分析中显示出以下优异性能：

- 优异的系统稳定性：对分别采用蛋白沉淀法、液液萃取法、免疫亲和分离配合胰蛋白酶酶解法制得的人血浆样品，1 μL 连续进样1000针，结果显示系统稳定性良好。此进样量大约相当于在标准2.1 mm内径色谱柱上的200 μL 进样量。
- 在连续5天的试验期间，一对关键小分子能够维持极好的峰对称性和分离度。在第1次和第1000次进样时，在10%峰高时测定的分离度和峰宽分别是0.8和1秒。
- 在复杂单抗酶解样品的1000次进样中，就峰形和峰宽而言，色谱稳定性优异。
- 在整个研究过程系统压力恒定，表明无基质成分残留在窄内径管路及接头处。对于复杂生物分析，该系统不易堵塞发生超压及色谱性能下降等问题。

参考文献

1. Fraser, I., *et al.*, The use of capillary high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry for the analysis of small volume blood samples from serially bled mice to determine the pharmacokinetics of early discovery compounds, *Rapid communications in Mass Spectrometry*, 1999, 13, 2366-2375.
2. Dear, G., *et al.*, Applications of capillary LC(-MS) to drug metabolism studies, LCGC Europe, 2001, 2-8.
3. Wells, D.A., *High throughput bioanalytical sample preparation*, 2003, Elsevier, St. Paul, Minnesota, USA.

沃特世感谢在本研究中BMS公司Eugene Ciccimaro、Bogdan Slecza、Celia D'Arienzo和Timothy Olah对抗样品的制备和使用过程中提供的无私帮助。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、ACQUITY UPLC、Xevo、MassLynx和“The Science of What's Possible”，是沃特世公司的注册商标。ionKey/MS、ionKey和iKey是沃特世公司商标。所有其它商标归各自所有者。

©2014 Waters Corporation. 在美国生产。2014年2月 720004953ZH AG-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