

在小分子定量生物分析中使用Ostro样品制备板去除磷脂的简单方法

Billy J. Molloy, Robert S. Plumb

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍如何应用Ostro直通式样品制备板去除血浆磷脂，以便随后对吉非替尼进行LC-MS分析。

优势

- 快速简单的样品制备过程
 - 充分去除磷脂和蛋白质
-

简介

定量生物分析可提供准确且精密的全身药物浓度水平数据，有助于在药物发现和药物开发过程中做出成功的决策。这些数据可用于药物发现阶段的化合物比较以及药物开发阶段的不同物质比较，并且为剂量范围研究提供药代动力学数据。LC-MS是小分子定量生物分析的首选平台。通过稳定、可重现的样品前处理流程提供不含蛋白质的萃取物，从而在测量候选药物浓度的同时保持最佳仪器性能并最大程度减少停机时间，是成功进行LC-MS生物分析的必要条件。

蛋白沉淀法是最简单、最实惠的血浆/血清样品前处理方法。该方法采用有机溶剂或酸性水溶液减少蛋白质周

围的溶剂层，使蛋白质聚集并从溶液中析出，从而发生沉淀。但这种方法得到的溶液较为复杂，通常包含血浆中的残留成分，这些成分可溶于脂质、胺和小分子有机酸等水性有机溶剂混合物。上述残留基质组分可能会污染质谱仪离子源，导致质谱仪响应能力减弱和系统停机。固相萃取和液-液萃取法可以显著改善萃取物的洁净度，有利于进行浓缩步骤，从而提高灵敏度。但这两种方法都极为耗时，并且需要进行方法开发。

Ostro直通式样品制备板针对磷脂和蛋白质去除提供了一套全新的解决方案。该解决方案无需进行复杂的方法开发，有助于实现快速简单的样品前处理过程（针对血浆/血清），同时可以实现优异的样品净化效果。本应用纪要介绍如何应用Ostro直通式样品制备板去除血浆磷脂，以便随后对吉非替尼进行LC-MS分析。

实验

用四倍样品体积的甲醇或含1%甲酸的甲醇沉淀蛋白质，制得小鼠血浆样品。

标准方法是将10 μL 血浆与40 μL 包含稳定同位素标记吉非替尼（图1）的甲醇溶液混合，涡旋混匀，并在25000 g离心力下离心5 min。取10 μL 所得上清液，用490 μL 50:50甲醇:水以1:50的比例进行稀释。

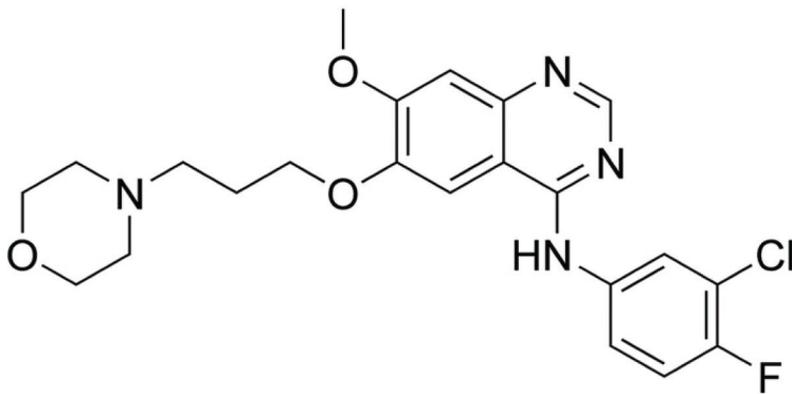


图1. 吉非替尼的结构

Ostro样品板方法是将10 μL 样品加入Ostro样品板中，再加入40 μL 包含稳定同位素标记吉非替尼的甲醇溶液，然后向样品中加入200 μL 包含1%甲酸的甲醇溶液，用抽吸的方式混合样品（图2）。利用真空条件使样品通过Ostro样品板。取50 μL 所得溶液，用450 μL 50:50甲醇:水以1:10的比例进行稀释。

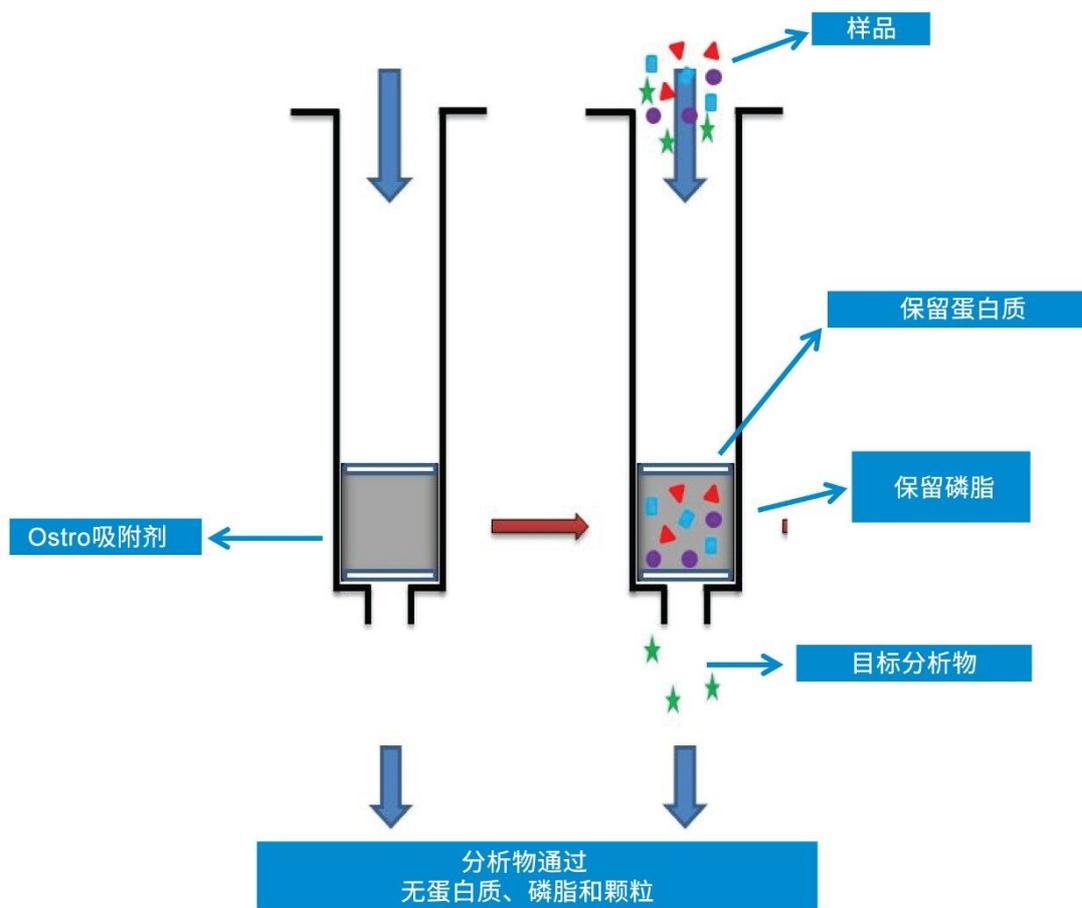


图2.Ostro直通式样品制备萃取方案

方法条件

示例参数如下所示，您可以根据具体实验室条件进行必要的调整。如果执行该方案需要使用非沃特世品牌的设备或一次性设备，应详细说明。

LC条件

系统：ACQUITY UPLC I-Class PLUS

检测：Xevo TQ-S micro串联四极杆质谱仪

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 1.7

μm , 2.1 \times 100 mm (部件号
: 186002352)

柱温: 60°C

样品温度: 6 °C

进样体积: 2 μL

流速: 650 $\mu\text{L}/\text{min}$

流动相A: 0.1%甲酸水溶液+ 10 mM醋酸
铵

流动相B: 0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度: 线性梯度: 2.9 min内, B由
5%增加至50%, 然后用95%
B冲洗1.5 min

MS条件

系统: Xevo TQ-S micro

电离模式: 正离子ESI

MS检测: 磷脂母离子, 质量数184

MRM检测: 易瑞沙446.6 \Rightarrow 128.23

MRM检测: 内标(d6) 452.6 \Rightarrow 134.23

毛细管电压: 2 kV

碰撞能量: 33

锥孔电压： 30 V

数据管理

数据采集软件： MassLynx 4.2版

数据处理和定量分析软件： TargetLynx

结果与讨论

有大量文献记载，磷脂会引起离子抑制和离子源污染，对LC-MS定量分析的性能产生不利影响^{1,2}。去除基质中的这些磷脂可提高分析灵敏度、稳定性和精密度。为评估Ostro样品制备板的磷脂去除率，本研究选择利用常规发现DMPK分析对吉非替尼进行定量分析。吉非替尼是一种处方药，用于治疗乳腺癌、肺癌及其它癌症，药品名为“易瑞沙”（图1）。吉非替尼的分子式为 $C_{22}H_{24}ClFN_4O_3$ ，平均分子量为446.902 g/mol，单一同位素分子量为446.152。该化合物的生物利用度为60%，蛋白结合率高于90%，并在肝脏中发生首过代谢(CYP3A4)形成o-去甲基代谢物³。

之前的数据表明，用乙腈进行蛋白沉淀的结果较差，因此本实验采用甲醇进行蛋白沉淀。Ostro样品制备板萃取吉非替尼也采用相同的溶液进行。萃取完成后稀释样品，确保最终体积和浓度保持恒定。利用反相梯度色谱法分析样品，并在正离子模式下采用 $m/z = 184$ 的母离子进行监测，检测样品中的磷脂组分。有机溶剂蛋白沉淀法和Ostro直通式样品制备板所得的色谱图如图3所示；从图中可以看到，经Ostro样品制备板萃取所得样品表现出的磷脂信号（红色迹线），明显低于有机溶剂法萃取所得样品的信号（绿色迹线）。

184母离子：比较

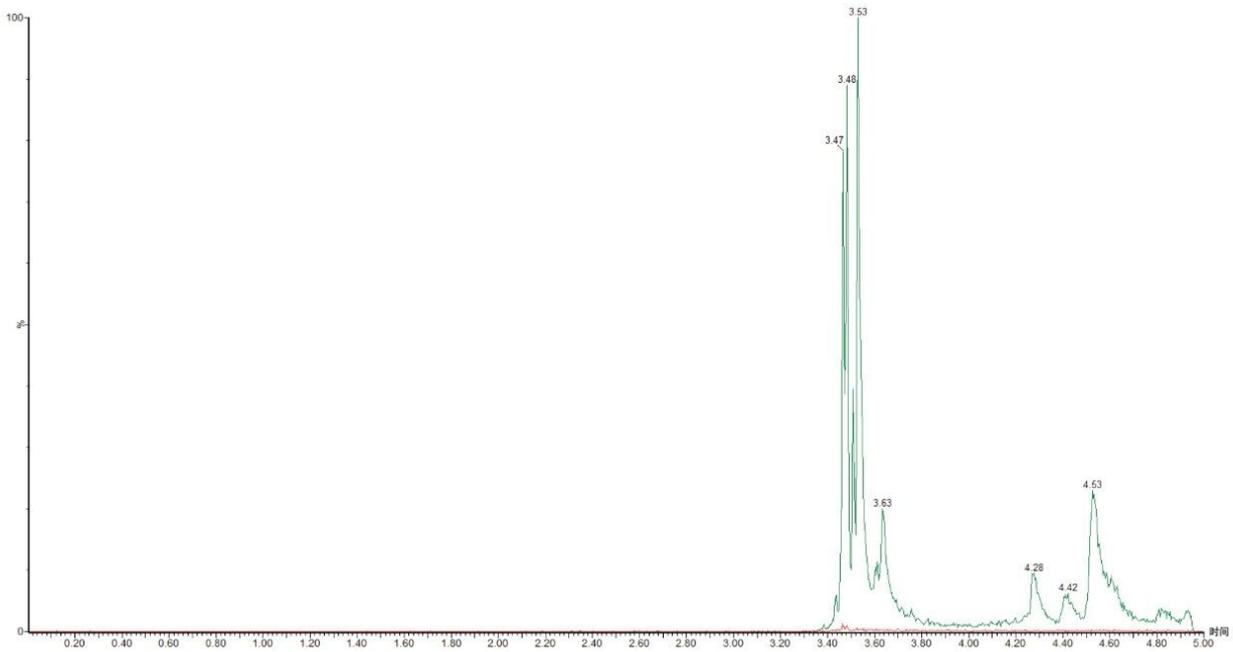
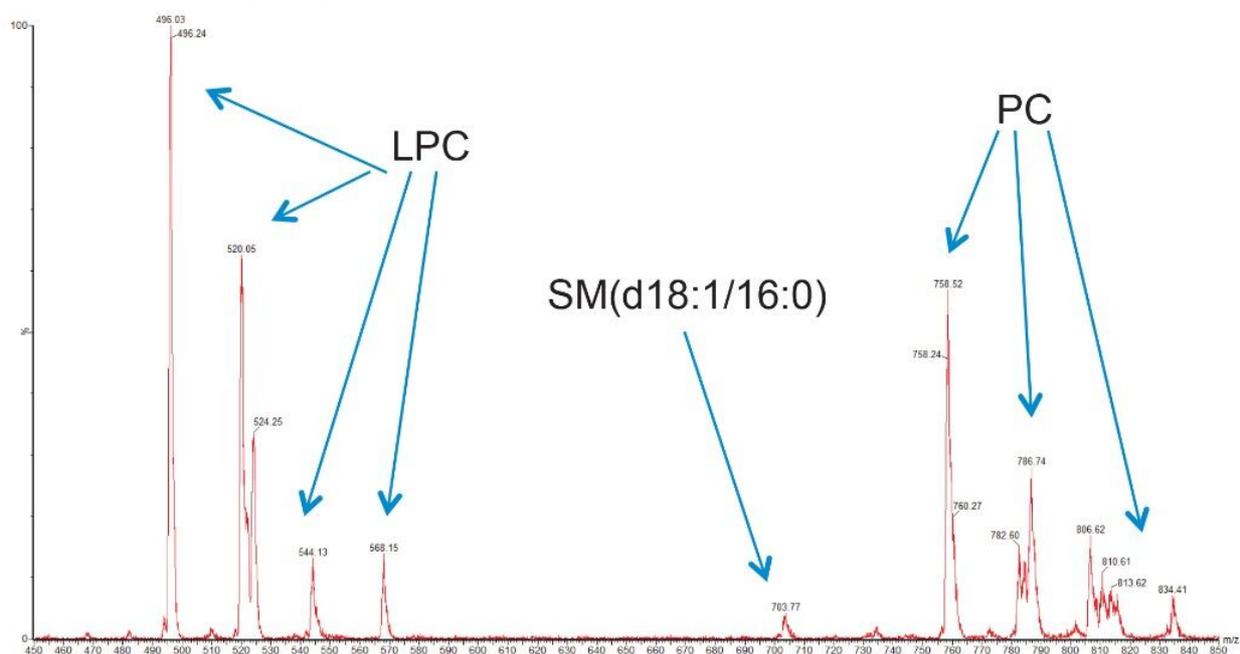


图3.利用Ostro样品制备板（红色迹线）和有机溶剂蛋白沉淀法（绿色迹线）得到的 $m/z = 184$ 的母离子的LC-MS色谱图

为进一步说明样品中的磷脂污染，研究合并了3.4~4.8 min色谱区域内的质谱图。得到的质谱图如图4所示（上方迹线采用有机溶剂法获得，下方迹线采用Ostro样品制备板获得）。从图中可以看出，有机溶剂法获得的样品中存在与溶血磷脂酰胆碱(LPC)母离子 $m/z = 496$ 、520、524、544和568以及磷脂酰胆碱(PC)母离子 $m/z = 758$ 、782、786、806和834相关的较高质谱信号。还存在清晰可见的鞘磷脂(d18:1/16:0)信号。与之相比，在经过Ostro样品制备板萃取所得样品的同一实验结果（下方迹线）中，色谱图相同区域未显示 $m/z = 184$ 通道的母离子信号。上述结果说明Ostro样品制备板可有效去除血浆样品中的磷脂和蛋白质。

4A. 有机溶剂蛋白沉淀法



4B. Ostro 样品制备板

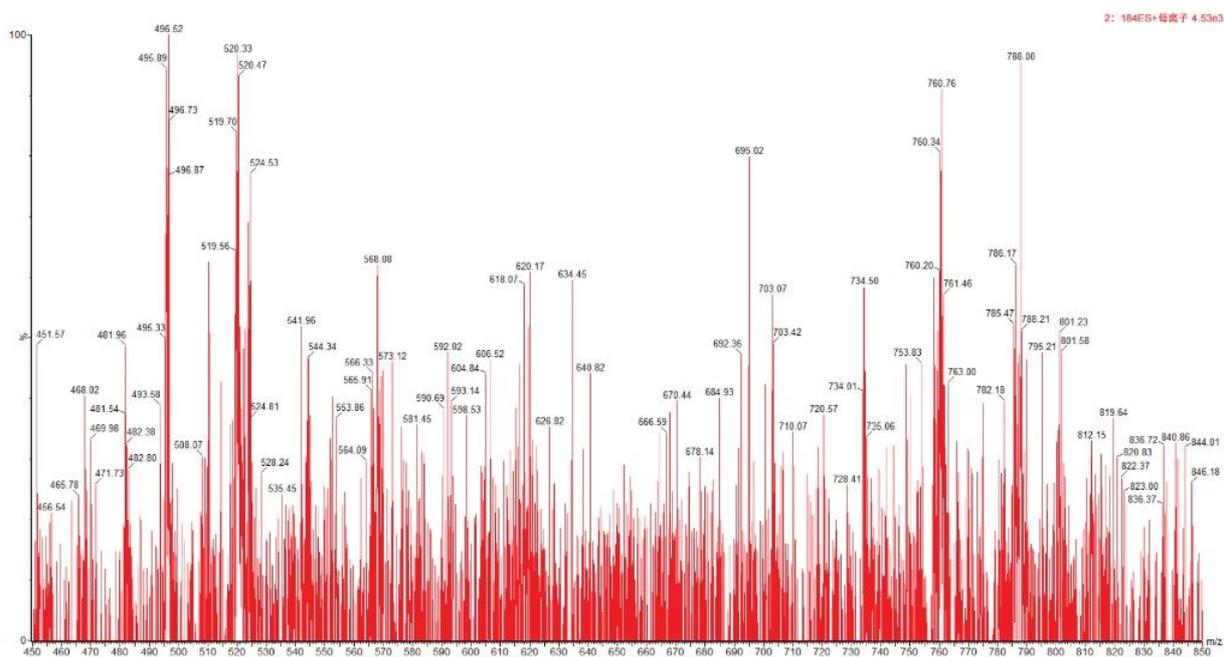


图4.图3中3.4 min至4.8 min之间色谱图的累加谱图比较。谱图分别对应为：(A)有机溶剂蛋白沉淀法(B)Ostro样品制备板。

给药后24 h内，吉非替尼的全身暴露水平通常为50~7000 ng/mL。研究证明，使用1/x权重和内标校准时，吉非替尼分析方法在15~7500 ng/mL范围内呈线性（图5）。相关系数为(r^2)为0.998810，截距为0.03067。吉非替尼标准品和QC样品的信号响应在蛋白沉淀法所得信号响应的95%以内，由此可证明，即使在低浓度下，也没有发生分析物吸附到样品板上的情况。

化合物名称：易瑞沙
相关系数： $r = 0.999405$ ， $r^2 = 0.998810$
校准曲线： $0.00877024 * x + -0.0306697$
响应类型：内标（参比3），按峰面积算*（内标浓度/内标峰面积）
曲线类型：线性，原点：排除，加权：1/x，轴转：无

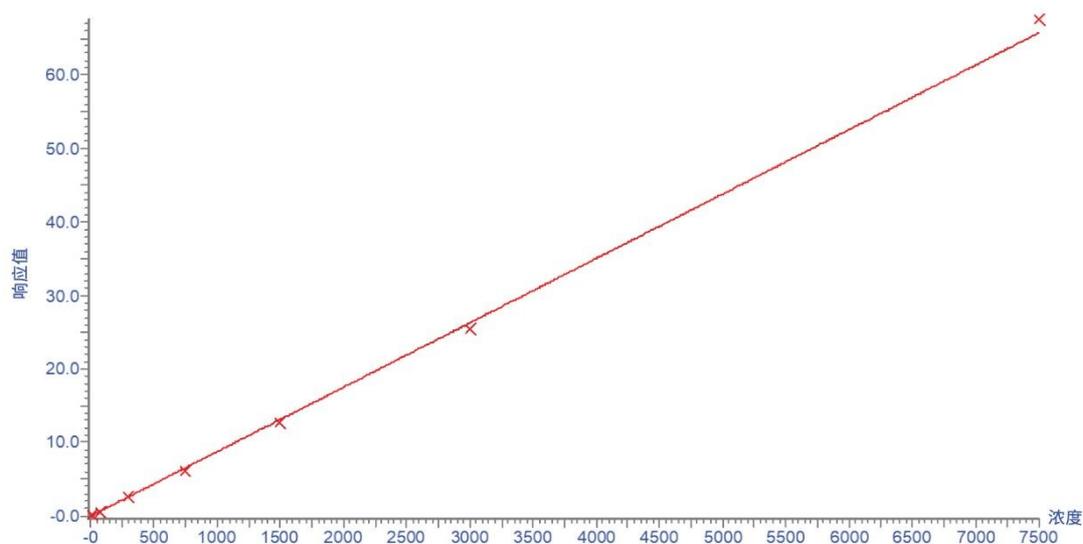


图5.使用Ostro直通式样品制备板时，小鼠血浆中吉非替尼（易瑞沙）在15~7500 ng/mL范围内的校准曲线。

结论

去除生物体液基质（例如血浆、血清或尿液）中的污染物，是减少离子抑制效应和避免质谱仪离子源污染的关键。Waters Ostro直通式样品制备板使用简单通用的方法去除血浆样品中的所有磷脂成分，无需经过复杂的样品前处理，并且无需进行复杂的方法开发和优化。与有机溶剂蛋白沉淀法相比的结果表明，分析物响应没有下降。研究表明，所得分析方法在15~7500 ng/mL的范围内具有线性响应。

参考文献

1. Lei, M.; Gan, W.; Sun, Y. HPLC-MS/MS analysis of peramivir in rat plasma: Elimination of matrix effect using the phospholipid-removal solid-phase extraction method. *Biomed.Chromatogr.* 2018, 32 (3).
2. An, G.; Bach, T.; Abdallah, I.; Nalbant, D. Aspects of matrix and analyte effects in clinical pharmacokinetic sample analyses using LC-ESI/ MS/MS - Two case examples. *Pharm.Biomed.Anal.* 2020, 30, 183:113135.
3. McKillop, D.; Partridge, E. A.; Hutchison, M.; Rhead, S. A.; Parry, A. C.; Bardsley, J.; Woodman, H. M.; Swaisland, H. C. Pharmacokinetics of gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in rat and dog. *Xenobiotica.* 2004, 34 (10) 901–915.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720006817ZH, 2020年4月