

使用ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier色谱柱改善磷酸类固醇药物定量分析的灵敏度

Nikunj Tanna, Robert S. Plumb, Lauren Mullin

Waters Corporation

摘要

携带富电子基团（例如磷酸盐和/或羧酸盐基团）的分析物容易与色谱系统和色谱柱的金属表面螯合，常常会导致峰形变差、灵敏度下降、稳定性和重现性不佳，这些因素都不利于成功开发生物分析方法。ACQUITY Premier系统和带有MaxPeak高性能表面(HPS)的ACQUITY Premier色谱柱可解决这一问题，这款色谱柱采用具有化学惰性的有机-无机杂化表面，可防止金属螯合，且不影响色谱选择性。

本应用纪要介绍了使用这种新型表面定量分析人血浆提取物中磷酸氢化可的松和磷酸地塞米松的影响。使用ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier色谱柱，磷酸氢化可的松的定量下限(LLOQ)改善了10倍，磷酸地塞米松的LLOQ改善了7.5倍。另外，更优异的整体色谱性能有助于获得更出色的峰形，实现稳定且可重现的峰积分，尤其是在低浓度分析中。

优势

改善峰形、简化峰积分、提高灵敏度

简介

生物分析实验室一直在努力提高灵敏度，因为他们希望更好地确定低全身浓度候选药物的药代动力学(PK)，或者在临床前或儿科研究中需要使用更少的样品量进行分析。多年来，MS仪器和样品萃取方案的不断发展使科学家能够实现更低的定量限，从而能够更深入地研究目标药物。但是，对于某些可能发生金属螯合问题的分析物，当前的仪器平台仍然面临重大挑战。例如某些含有磷酸基团（例如ATP）、不带电荷的胺和去质子化羧酸基团（柠檬酸基团、乳酸基团等）的化合物，由于富含电子，容易吸附到金属表面上，比如液相色谱系统中所用的不锈钢。这可能会对生物分析方法产生不利影响，导致方法开发过程复杂、数据分析耗时、分析灵敏度不足以及重现性不佳。为尝试解决这些问题，生物分析人员采用螯合剂作为流动相添加剂，使用PEEK连接管路以及进行系统钝化¹。但是，这些解决方案并不理想，因为它们只能解决一时的问题，并且具有不兼容DMSO等溶剂、降低分析物电离效率导致灵敏度下降等问题¹。

为解决这些挑战，沃特世开发出一类新技术，称为MaxPeak高性能表面(HPS)。ACQUITY Premier中的MaxPeak HPS由高度交联的弹性层组成，化学性质与亚乙基桥杂化硅胶颗粒相似¹。MaxPeak HPS可提供一层有效的表面屏障，减少分析物与金属表面的不良相互作用。本文以磷酸氢化可的松和地塞米松磷酸钠为例重点介绍了搭载MaxPeak HPS的ACQUITY Premier解决方案在生物分析中的优势。磷酸地塞米松和磷酸氢化可的松是治疗内分泌失调以及免疫和过敏性疾病（例如关节炎、牛皮癣、狼疮和溃疡性结肠炎）的皮质类固醇抗炎药²。对于存在严重呼吸道症状的COVID-19患者，也建议使用磷酸地塞米松³。因此，研究人员对提高这些化合物的检测灵敏度表现出浓厚的兴趣。

实验

样品制备

将冻干形式的磷酸氢化可的松和磷酸地塞米松溶于DMSO中，制得浓度为1 mg/mL的储备液。用5%甲醇水溶液进一步稀释储备液，制得浓度为100 µg/mL和10 µg/mL的工作标准溶液。然后将这些工作标准溶液加入人血浆中，制得标准曲线标样：磷酸氢化可的松的浓度范围为5~1000 ng/mL，磷酸地塞米松的浓度范围为1~1000 ng/mL。每个样品取100 µL转移至微量离心管中，并用300 µL甲醇萃取。将样品涡旋混合，然后以13,000 rcf的转速离心10 min。取200 µL上清液转移至LC-MS样品瓶中，然后进样分析。

方法条件

两种分析物的MRM方法均使用QuanOptimize进行开发。采用通用的短时间梯度LC方法进行分析。方法详情如下。

液相色谱条件

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier或ACQUITY UPLC I-Class
检测器:	Xevo TQ-XS
色谱柱:	ACQUITY Premier HSS T3, 1.8 μ m, 2.1 x 50 mm, 或ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μ m, 2.1 x 50 mm
柱温:	60 °C
样品温度:	5 °C
进样体积:	10 μ L
流速:	600 μ L/min
流动相A:	0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度:	流动相B在2.5 min内从5%增至75%

质谱条件

质谱系统：	Xevo TQ-XS
电离模式：	ESI+
采集范围：	MRM
毛细管电压：	3 kV

MRM通道

磷酸氢化可的松：	443.19 > 327.15
磷酸地塞米松：	473.32 > 435.16

数据管理

质谱软件：	MassLynx v4.2
信息学软件：	TargetLynx XS

结果与讨论

由于磷酸氢化可的松和磷酸地塞米松的理化特性，这些分析物容易吸附在不锈钢表面上。这种现象在低浓度条件下更为明显，因为分析物可能在进样针、传输管路、预加热器和色谱柱硬件上损失大部分甚至全部。沿着系统流路使用化学惰性表面来减少这些相互作用，可能会增加到检测器的分析物数量，从而改善能够实现的定量下限(LLOQ)，并提高分析精密度。

为验证这一假设，使用上述步骤提取标准曲线标样和QC样品，进样至搭载ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY

Premier系统以及搭载标准ACQUITY UPLC色谱柱的常规ACQUITY UPLC系统。

如图1A的上方色谱图所示，使用搭载ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统时，磷酸氢化可的松的LLOQ为5 ng/mL，信噪比大于15。图1A的下方色谱图是使用常规ACQUITY液相色谱系统和UPLC色谱柱进样分析同一样品得到的结果。下方色谱图中的峰强度明显降低，信噪比小于3，日间和日内CV明显更高，可能影响重现性，尤其是对于低浓度样品。同样，如图1B的上方色谱图所示，磷酸地塞米松的LLOQ为1 ng/mL，信噪比大于10。而在使用常规液相色谱系统分析同一样品得到的色谱图中，峰强度明显更低，如图1B的下方色谱图所示，信噪比小于4。图1C比较了50 ng/mL磷酸氢化可的松在两套系统中获得的响应，该浓度是搭载标准ACQUITY色谱柱的标准ACQUITY液相色谱系统可以准确定量的最低浓度。使用相同的积分参数比较标准系统硬件与ACQUITY Premier系统/色谱柱获得的峰，后者不仅表现出明显更高的峰面积响应，并且观察到更对称的峰形，因此具有更高的积分重现性。图1D比较了7.5 ng/mL磷酸地塞米松的色谱图，该浓度是采用标准系统和色谱柱组合观察到的定量下限。两套系统获得的峰面积响应和峰形相似。但是，在标准系统/色谱柱上进样浓度低于7.5 ng/mL的样品时，根本不出峰，或者得到不可重现的峰，无法用于准确积分。缺乏重现性可能是因为分析物在系统上发生吸附。在搭载ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统上，分析物从7.5 ng/mL低至1 ng/mL的所有浓度均表现出清晰界定的色谱峰，可用于准确积分，且峰响应随浓度提高而线性增加。

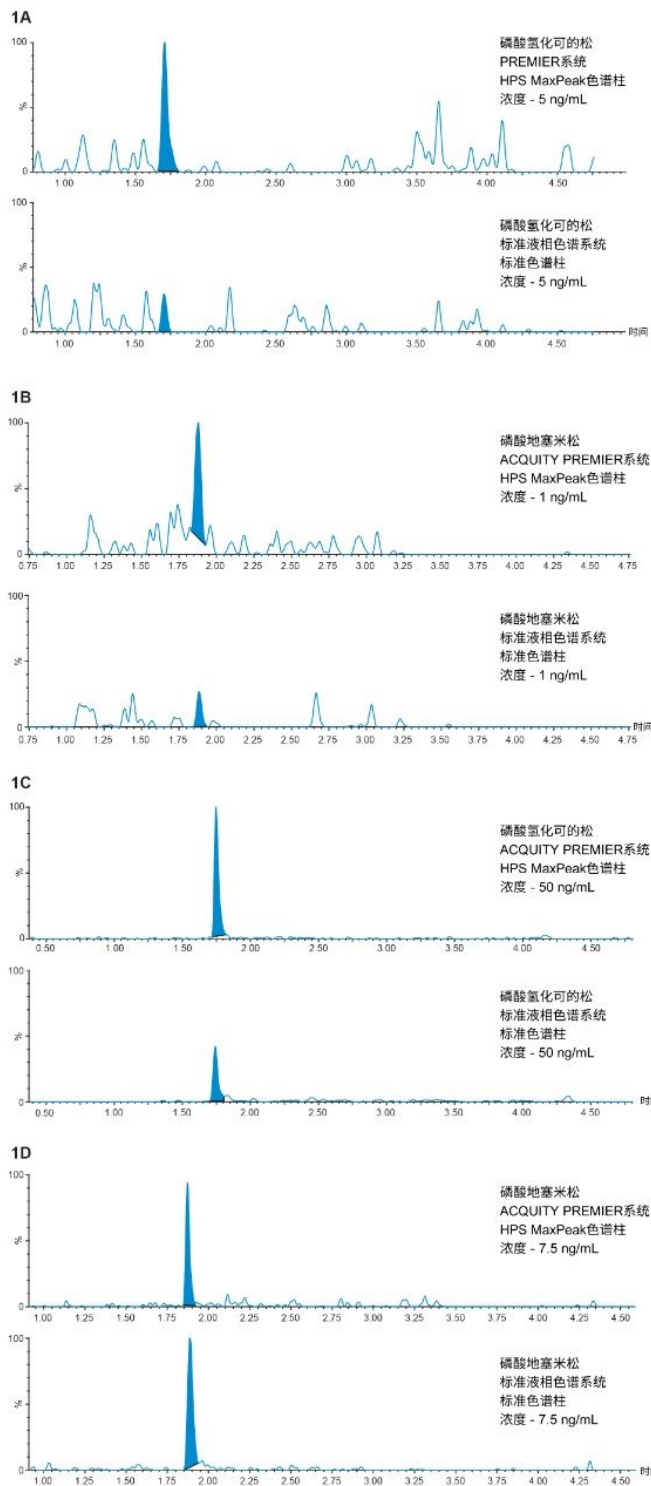


图1A.磷酸氢化可的松 – 搭载ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统与搭载标准色谱柱的标准ACQUITY

液相色谱系统之间的LLOQ比较。

1B.磷酸地塞米松 – 搭载ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统与搭载标准色谱柱的标准ACQUITY液相色谱系统之间的LLOQ比较。

1C.磷酸氢化可的松 – 搭载ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统与搭载标准色谱柱的标准ACQUITY液相色谱系统之间的LLOQ比较。

1D.磷酸地塞米松 – 搭载ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统与搭载标准色谱柱的标准ACQUITY液相色谱系统之间的LLOQ比较。

使用ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier色谱柱，采用加权因子 $1/x$ ，磷酸氢化可的松在5~1000 ng/mL范围内获得线性标准曲线($r^2 > 0.993$)，磷酸地塞米松在1~1000 ng/mL范围内获得线性标准曲线($r^2 > 0.992$) (图1A)。磷酸氢化可的松的斜率和截距分别为0.043和0.054，磷酸地塞米松的斜率和截距分别为0.119和0.129。这些值接近0，意味着标准曲线的偏差可忽略不计，因此使用这些标准曲线可以更准确地定量未知样品。此结论通过计算两种分析物在LLOQ和低、中、高QC水平下的准确度和精密度数据得到确认。磷酸氢化可的松的分析准确度为98%~102%，精密度为<11% (图1B)。磷酸地塞米松的分析准确度为92%~112%，精密度<8% (图1C)。

	线性范围 (ng/mL)	加权	r^2	斜率	截距
磷酸氢化可的松	5-1000	1/x	0.993	0.043	0.054
磷酸地塞米松	1-1000	1/x	0.992	0.119	0.129

表1A.磷酸氢化可的松和磷酸地塞米松的标准曲线统计数据。

	预期浓度 (ng/mL)	平均实测浓度 (ng/mL)	精密度 (%)	准确度 (%)
LLOQ	5	5.03	9.39	100.67
LQC	10	10.20	6.86	102.00
MQC	75	73.90	10.53	98.53
HQC	750	743.63	7.13	99.15

表1B.磷酸氢化可的松的精密度和准确度统计数据。

	预期浓度 (ng/mL)	平均实测浓度 (ng/mL)	精密度 (%)	准确度 (%)
LLOQ	1	0.97	5.97	96.67
LQC	10	11.10	4.68	111.00
MQC	75	80.17	4.39	106.89
HQC	750	694.73	7.49	92.63

表1C.磷酸地塞米松的精密度和准确度统计数据。

低、中、高QC水平下磷酸氢化可的松（图2A）和磷酸地塞米松（图2B）的代表性色谱图显示，两种分析物的峰面积计数均随浓度线性增加。

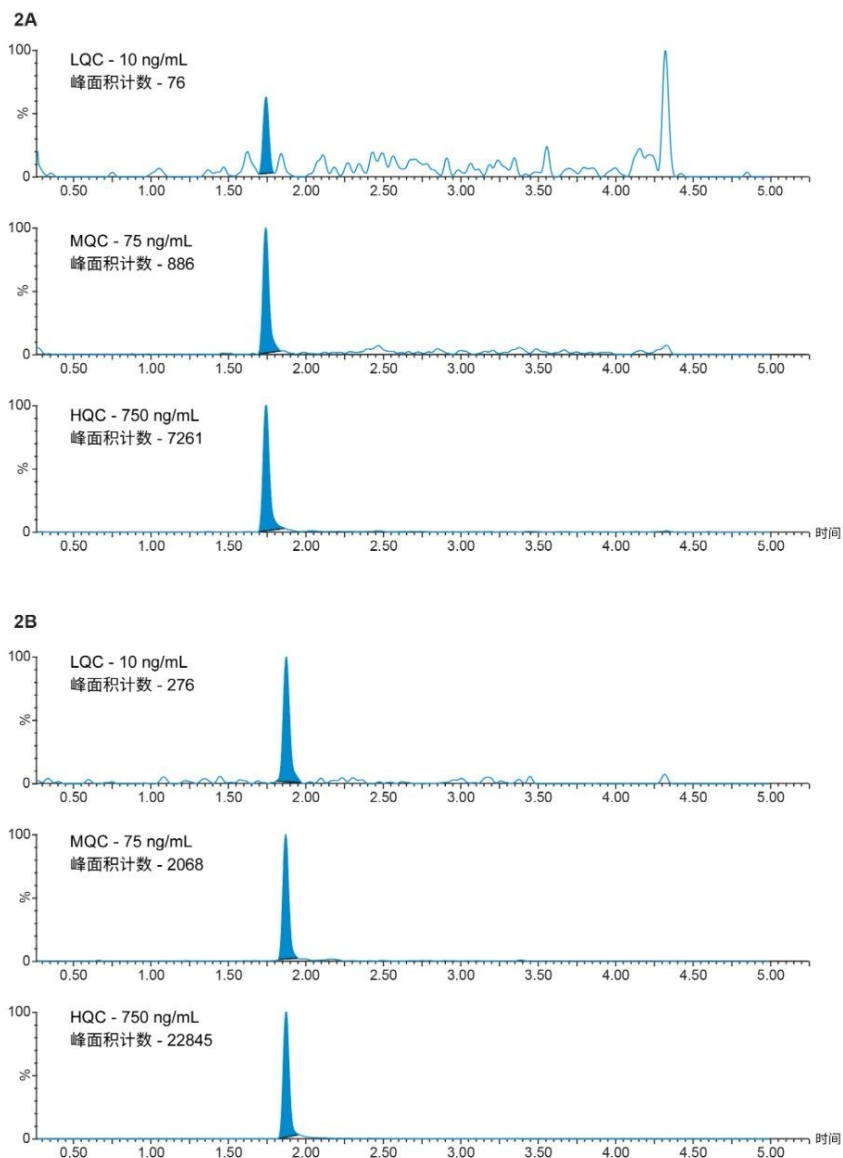


图2.(A)采用搭载ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统分析磷酸氢化可的松获得的代表性QC色谱图。(B)采用搭载ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统分析磷酸地塞米松获得的代表性QC色谱图。

结论

采用标准液相色谱系统和色谱柱硬件定量分析金属敏感化合物时存在峰形不佳和重现性差的问题，导致无法实现低LLOQ。

使用搭载ACQUITY Premier色谱柱的ACQUITY Premier系统分析磷酸氢化可的松和磷酸地塞米松表现出以下优势：

- 磷酸氢化可的松和磷酸地塞米松的灵敏度分别提升10倍和7.5倍
- 峰形更窄、更对称，可实现重现性更高的积分，尤其是在低浓度分析中
- 磷酸氢化可的松和磷酸地塞米松在LLOQ、LQC、MQC和HQC水平下的分析精密度分别为<11%和<8%

参考资料

1. Hassn M. E. Dexamethasone in Severe COVID-19 Infection: A Case Series. *Respiratory Medicine Case Reports*. 2020, 31, 101205.
2. Cevc, G.; Blume, G. Hydrocortisone and Dexamethasone in ery Deformable Drug Carriers Have Increased the Biological Potency, Prolonged Effect, and Reduced Therapeutic Dosage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2004, 663 (1-2), 61-73.
3. Lauber, M.; *et al.* Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces. Waters White Paper, 720006930EN <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135074404>> , 2020.

特色产品

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

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

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

MaxPeak Premier色谱柱 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135074078>>

720007095ZH, 2021年2月修订

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号