

在发现生物分析中使用ACQUITY™ Premier UPLC™系统和Xevo™ TQ Absolute质谱仪定量人和大鼠血浆中的华法林和呋塞米

Nikunj Tanna, Robert S. Plumb

Waters Corporation

摘要

高准确度和精密度的药物化合物定量分析对于药物发现和开发过程至关重要。UHPLC与串联四极杆质谱联用方法是此类分析的黄金标准。由于人们对定量较低浓度的候选药物和生物标志物愈发重视，因此需要更加灵敏的仪器平台。本应用纪要介绍了一种从人和大鼠血浆中提取和定量两种代表性模型化合物（华法林和呋塞米）的通用方法。

华法林是一种抗凝剂，用于治疗 and 预防血栓栓塞。必须仔细、持续地监测华法林，确保药物浓度保持在范围较窄的治疗窗内。呋塞米是一种利尿剂，用于治疗心力衰竭、肝病或肾病患者的水肿。

使用ACQUITY™ Premier UPLC系统和Xevo™ TQ Absolute质谱仪在负离子ESI模式下运行，大鼠和人血浆中的华法林和呋塞米分别在0.025–100 ng/mL和0.1–100 ng/mL范围内获得线性校准曲线。两种基质中两种分析物的校准曲线和QC上所有点的CV百分比均低于13%。

优势

- 高准确度、高精密度、高灵敏度定量分析

- 华法林和咪塞米
- ACQUITY Premier UPLC系统
- Xevo TQ Absolute质谱仪

简介

生物分析可以提供有关药物浓度、代谢物和体内相关生物标志物的定量信息，在药物发现和药物开发阶段发挥着关键作用。这些数据有助于在药物发现和开发流程的各个步骤中针对药物的吸收、分布、代谢、排泄和毒理学(ADMET)特征及其进展情况及时做出决策。开发LC-MS方法是发现生物分析实验室的常规操作，他们每周需要分析数百种化合物的PK样品¹。因此，这些实验室需要尽可能简化样品提取、LC以及MS方法中的许多步骤。但是，对通用方法的实际需求必须与对给定分子或分子组实现适当灵敏度的需求相平衡²。在这种情况下，拥有一款适用于所有分析物类型的仪器平台可以显著增加成功的机会。由于一些分析物中存在不带电荷的胺、磷酸盐和脱质子羧酸，或者有失去质子的倾向并在质谱仪离子源中携带负电荷，因此它们往往具有金属螯合特性，这一特性让这些分析物对于实验室来说十分具有挑战性。由于缺乏合适的分析平台，导致这类分子非常难以分析。在本应用纪要中，我们使用华法林和咪塞米作为代表性分子在一家典型的发现生物分析实验室开展了研究。

使用ACQUITY Premier UPLC系统和Xevo TQ Absolute质谱仪定量从人和大鼠血浆中提取的华法林和咪塞米，LLOQ分别为25 pg/mL和100 pg/mL。两种基质中两种分析物的校准曲线和QC上所有点的CV百分比均低于13%。

实验

用100 ng/mL的华法林和咪塞米储备液加标大鼠和人血浆，建立0.025-100 ng/mL的校准曲线。使用单独的储备液(100 ng/mL)生成LLOQ、LQC、MQC和HQC的QC样品。使用乙腈按1:3的比例进行蛋白沉淀，所有样品均提取100 μ L，一式三份。将样品离心，上清液转移到LC-MS样品瓶以供分析。

液相色谱条件

液相色谱系统:

ACQUITY™ Premier UPLC系统

检测:	Xevo™ TQ Absolute质谱仪
样品瓶:	沃特世全回收LCMS样品瓶
色谱柱:	MaxPeak™ UPLC HSS T3 2.1 x 50 mm色谱柱
柱温:	60 °C
样品温度:	5 °C
进样体积:	1 µL
流速:	600 µL/min
流动相A:	含0.01%甲酸的100%水溶液
流动相B:	含0.01%甲酸的100%乙腈溶液
梯度:	在1.5 min内从5%增至95%

质谱条件

质谱系统:	Xevo™ TQ Absolute
电离模式:	ESI-
毛细管电压:	0.5 kV

MRM通道

分析物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (kV)
华法林	307.01	249.98	24	24
华法林	307.01	160.89	24	20
呋塞米	328.8	77.80	20	30

结果与讨论

ACQUITY Premier系统采用了新型MaxPeak™高性能表面(HPS)技术，该技术可有效降低因金属相互作用所导致的非特异性吸附损失。在发现生物分析实验室环境中（可以看到整个药物物理化学空间中的各种分析物），这样的技术可以显著减少方法开发和样品分析时间；不再需要衍生化等复杂的样品前处理步骤，以及高级的色谱柱、缓冲液和流动相。Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪是一种新型的高性能串联四极杆质谱仪，它设计紧凑、拥有更强的负离子检测性能和可拆卸式离子源外壳，能够减少样品基质和流动相缓冲盐带来的离子源污染。这些属性使常规、耐用且灵敏的检测器能发挥理想性能，在正离子模式和负离子模式下均能提供优异的灵敏度，并为每周需要运行数百个样品的实验室尽可能减少停机清洗时间。

使用上述样品提取和LC-MS方法，我们能够使大鼠和人血浆中华法林的LLOQ达到25 pg/mL（图1）。这些LLOQ是根据信噪比为5的情况确定的，并与空白提取样品中同一保留时间的值比较。同样，人和大鼠血浆中呋塞米的LLOQ均确定为100 pg/mL（图2）。

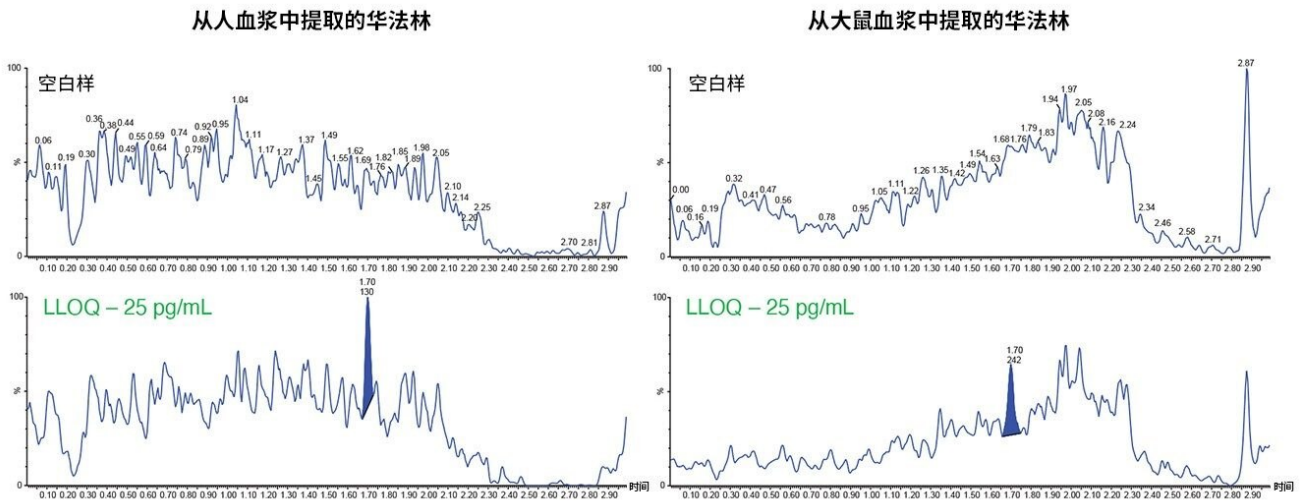


图1.从人和大鼠血浆中提取的华法林的LLOQ

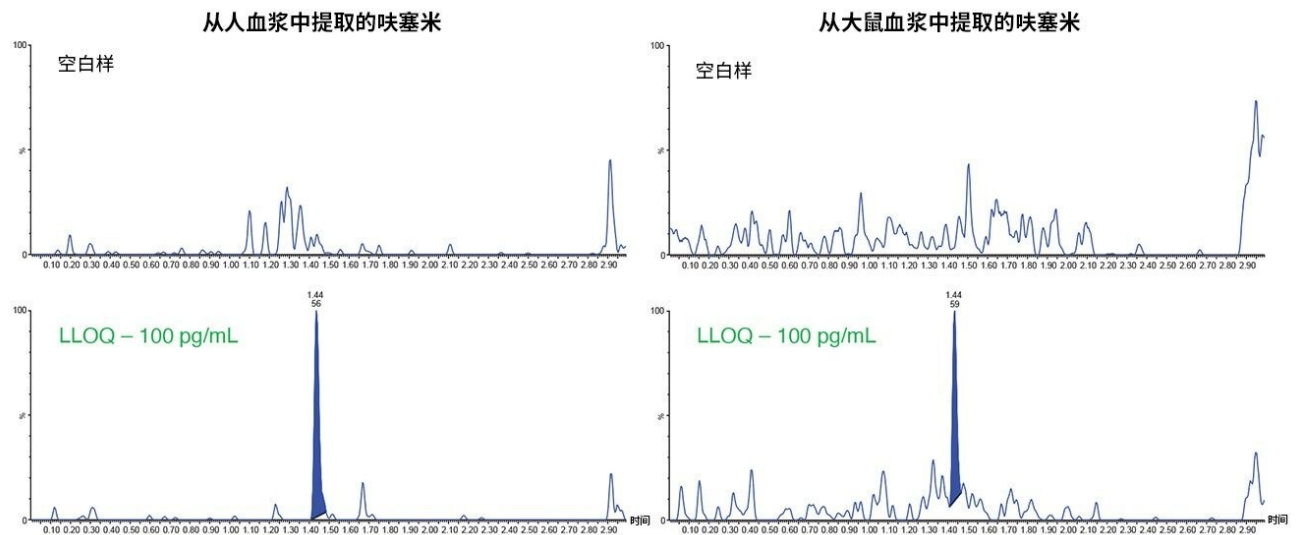


图2.从人和大鼠血浆中提取的萘普生的LLOQ

两种分析物的观测MS响应均呈线性增加，如校准曲线上各浓度样品的代表性色谱图所示（图3）。

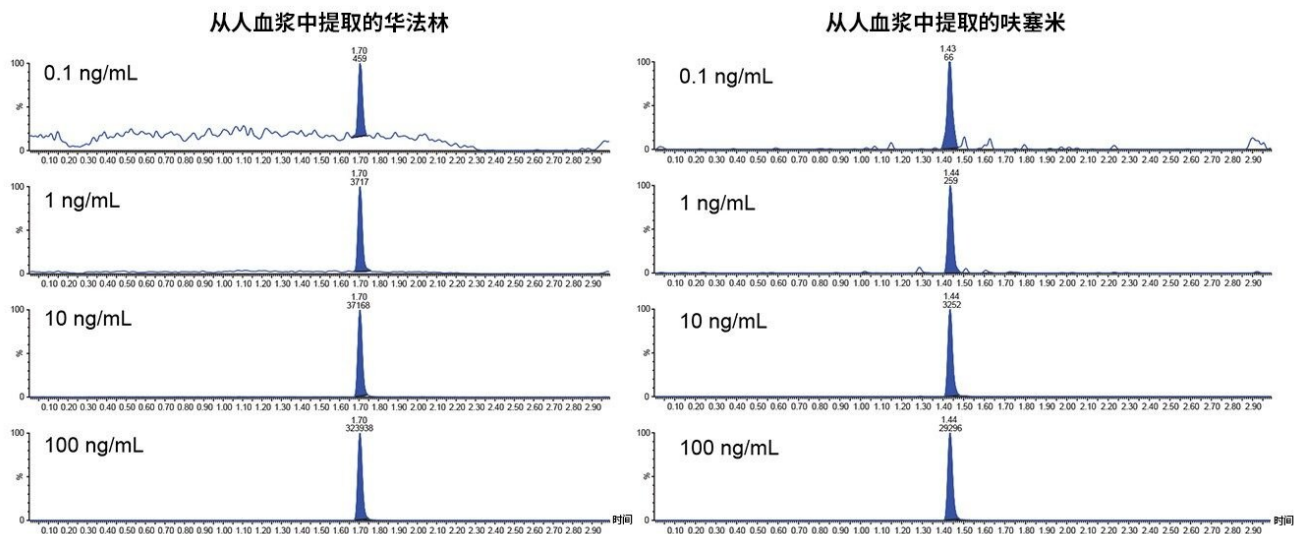


图3.从人血浆中提取出的华法林和咲塞米在校准曲线上不同浓度点的代表性色谱图

将校准曲线和QC上的所有点每天重复提取三次，各浓度水平上所有点的%CV均<12%（表1）。

人血浆中的华法林					
	预期浓度 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	标准偏差	% CV	%准确度
LLOQ	0.075	0.074	0.002	9.26	98.44
LQC	1	1.01	0.08	8.37	100.66
MQC	10	10.71	0.46	4.30	107.05
HQC	75	77.87	3.75	4.81	103.82

人血浆中的咲塞米					
	预期浓度 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	标准偏差	% CV	%准确度
LLOQ	0.25	0.26	0.01	11.42	101.88
LQC	1	0.97	0.04	8.94	97.08
MQC	10	10.75	0.50	4.63	107.75
HQC	75	76.32	1.77	2.33	101.76

表1.从人血浆中提取华法林和咲塞米的日间准确度和精密度（3天，每天重复三次）

结论

使用ACQUITY Premier UPLC系统和Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪定量从人和大鼠血浆中提取的华法林和呋塞米。观察结果如下：

- 人和大鼠血浆中华法林和呋塞米的LLOQ分别为25 pg/mL和100 pg/mL。
- 校准曲线和各QC浓度上所有点的%CV均<12%，完全位于生物分析验收标准的允许范围内。

ACQUITY Premier UPLC系统和Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪可提供优异的稳定性和灵敏度，方法性能不受影响，因此成为适用于发现生物分析实验室的理想平台。

参考资料

1. Bateman KP, Cohen L, Emary B, Pucci V., Standardized Workflows for Increasing Efficiency and Productivity in Discovery Stage Bioanalysis, *Bioanalysis*.2013 Jul;5(14):1783–94.
2. Meng M, Wang L, Voelker T, Reuschel S, Van Horne K, Bennett P., A Systematic Approach for Developing a Robust LC-MS/MS Method for Bioanalysis, *Bioanalysis*.2013 Jan;5(1):91–115.doi: 10.4155/bio.12.295.

特色产品

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

Xevo TQ Absolute质谱仪 </nextgen/cn/zh/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>

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

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

720007573ZH, 2022年3月

© 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