

小分子药物生物分析的高质量色谱图

High-quality chromatography for bioanalysis of small molecule pharmaceuticals

评价ExionLC™ 2.0系统的表现和可靠性

Ian Moore, Adrian M Taylor

SCIEX, Canada

可靠的LC-MS/MS方法对支持药物研究中从发现到临床研究的所有阶段来说是很必不可少的。生物分析专家总是在建立方法时挑战足够的灵敏度和选择性，同时保持可靠性，这样，最终的方法可以用于很广的样本范围。在跨越校准范围的所有浓度水平，以及很多不同的基质来源，为了产生稳定的结果，建立的方法必需能够提供较高的重复性。

一个成功获得选择性、重复性以及可靠性的质谱实验的重要方面是将这些特点与高质量、前沿样本分离相结合。在大多数案例中，使用液相色谱（LC）可以获得这些性能。本技术文件中，使用大鼠血浆中的小分子药物分析研究了SCIEX ExionLC™ 2.0系统的关键表现，特别是线性、精密度和残留。使用SCIEX Triple Quad™ 5500+系统进行检测。

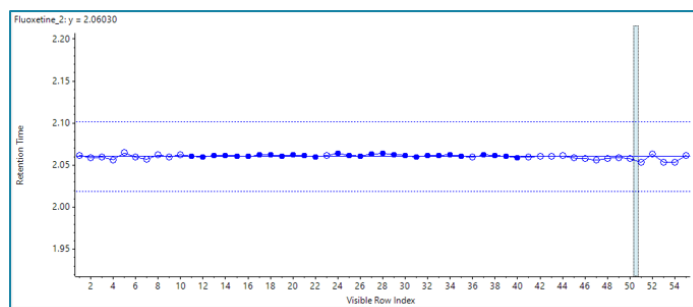


图1. 保留时间的精密度。显示了超过50次进样时，ExionLC™ 2.0系统对氟西汀（Fluoxetine）的保留时间变异性。结果显示了良好的保留时间稳定性，RSD在2%以内（虚线）。

ExionLC™ 2.0 系统的关键特点

- 二元高压、系列活塞泵最高耐压为860 bar，流速范围为0.001到2 mL/min。
- 精确稳定的溶剂流速,保留时间变化RSD低于1%。
- 准确和精密的定量结果，检测性能的线性相关系数（ r^2 ）>0.99，浓度变化的系数精密度<15%

方法

材料和方案: 使用SCIEX液质的试剂盒测试实验线性、精密度、交叉污染性能；产品编号5056817。

样品制备：使用沉淀大鼠血浆制备校准曲线，使用乙腈沉淀法制备空白基质样本。3倍冰冷乙腈加入到1倍大鼠血浆。涡旋溶液5 min，然后以10000x g的速度离心10 min。获取上清液，并加入同样体积的水，制备获得最终的基质溶液。标准溶液使用制备的基质溶液以系列稀释方法制备。表1显示了制备的标准样品。

表1. 校准标准品的浓度

| Standard name | Concentration (ng/mL) |
|---------------|-----------------------|
| Std 1 | 0.007 |
| Std 2 | 0.021 |
| Std 3 | 0.067 |
| Std 4 | 0.211 |
| Std 5 | 0.662 |
| Std 6 | 2 |
| Std 7 | 6 |
| Std 8 | 20 |
| Std 9 | 64 |
| Std 10 | 202 |

色谱条件：LC分离采用SCIEX ExionLC™ 2.0 系统进行。选择飞诺美 Kinetex C18 色谱柱 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, P/N: 00B-4475-AN)，使用均包含0.1%甲酸的水和乙腈的简单梯度，流速为0.5 mL/min。柱温设为40 °C。包括平衡，分析流程共3.5 min。进样速度设为标准，且速度因子为1。SCIEX ExionLC 2.0系统自动进样器采用于标准组成：250 μL注射针、100 μL样品定量环、250 μL缓冲液管，以及15 μL针管。对所有进样来说，为了使进样循环时间最小化，同时满足适合样本消耗，选择微升进样增强模式。一次进样体积为5 μL。ExionLC™ 2.0系统自动进样器使用先进的清洗模式控制，使用2 mL 含0.1% 甲酸的100% 异丙醇作为洗脱溶剂，且一个洗脱系列包含两次阀门清洗。

质谱条件：质谱使用SCIEX 5500+系统。离子源使用正电模式电喷雾离子化（ESI）。每个分析物使用两个MRM离子对。MRM条件列于表2。

表2. 本研究化合物的MRM离子对优化质谱参数

| Analyte | Q1 | Q2 | DP | CE |
|--------------------|-----|-----|-----|----|
| Carbamazepine 1 | 237 | 194 | 60 | 30 |
| Carbamazepine 2 | 237 | 179 | 60 | 48 |
| Fluoxetine 1 | 310 | 44 | 50 | 52 |
| Fluoxetine 2 | 310 | 148 | 50 | 12 |
| Sulfamethoxazole 1 | 254 | 156 | 60 | 22 |
| Sulfamethoxazole 2 | 254 | 92 | 60 | 36 |
| Trimethoprim 1 | 291 | 230 | 100 | 31 |
| Trimethoprim 2 | 291 | 261 | 100 | 34 |

数据获取使用Analyst™软件1.7.1和ExionLC 2.0系统获得。值得注意的是，ExionLC 2.0系统也完全支持使用SCIEX OS 软件2.1.5获取数据的仪器。

数据处理：LC-MS数据的数据处理使用SCIEX OS 软件 2.0.1 进行，校准曲线、精密度和准确度也能由其产生。

结果

图1显示重复进样50次氟西汀（Fluoxetine）的保留时间重复性，突出了ExionLC 2.0 系统产生梯度的稳定性。在这些分析中，一定保留时间范围内，各分析物保留时间精密度RSD在1% 之内。甲氧苄啉（Trimethoprim），磺胺甲恶唑（sulfamethoxazole），卡马西平（Carbamazepine）和氟西汀（Fluoxetine）的保留时间变化%RSD分别为0.40，0.10，0.06，和0.07，得到所有化合物保留时间最大差异不超过于1秒。

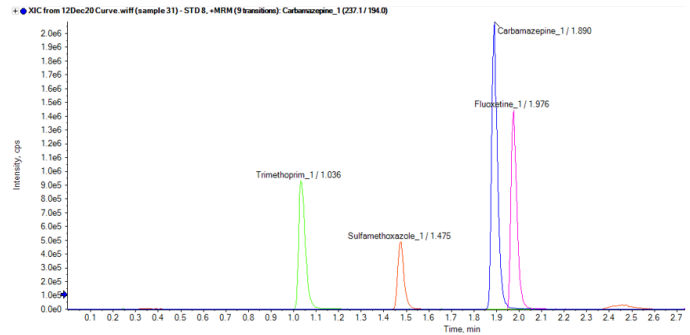


图2. 4种药物混合物的高质量分离的提取离子色谱图。化合物浓度水平为20 ng/mL，洗脱顺序依次为：甲氧苄啉（Trimethoprim）、磺胺甲恶唑（sulfamethoxazole）、卡马西平（Carbamazepine）和氟西汀（Fluoxetine）。

含有八个混标（20 ng/mL）的示例色谱图见图2，其中化合物获得了非常好的分离。

基质中各个分析物的LLOQ基于目前的生物分析方法指南测得：最低浓度标准浓度精密度的精度<20%，准确度在80-120%之间，峰面积响应至少为基质空白响应的5倍。

表3中列出了各分析物的LLOQ和校准曲线范围。校准曲线举例见图3。线性回归采用1/x权重。检测的全部化合物的线性系数（ r^2 ）均高于0.99。校准标准的准确度和精密度的精度如表4所示。

本研究检测的浓度范围覆盖了分析血浆中这些小分子药物的一个典型的动态范围磺胺甲恶唑（sulfamethoxazole）的提取例子色谱图。标准品10（200ng/mL）之后的空白进样表明一个简单快速的自动进样器清洗序列就可以提供满足可接受残留范围的分析要求。

表3. 药物小分子分析中化合物的标准曲线范围

| Analyte | LLOQ (ng/mL) | Calibration curve range (ng/mL) | Retention time (min) |
|------------------|--------------|---------------------------------|----------------------|
| Sulfamethoxazole | 0.067 | 0.067 - 200 | 1.48 |
| Fluoxetine | 0.067 | 0.067 - 200 | 1.98 |
| Trimethoprim | 0.067 | 0.067 - 64 | 1.04 |
| Carbamazepine | 0.021 | 0.021 - 67 | 1.90 |

结论

ExionLC™ 2.0系统作为超高压液相色谱（UHPLC）系统，它适用于血浆基质中药物小分子的生物分析。

- 精密稳定的溶剂流速使保留时间差异RSD在1%以下
- 准确精密的定量结果，其线性相关系数（ $r^2 > 0.99$ ），且精密度的精度<15%检测浓度范围变异系数，符合常规的小分子药物分析要求。

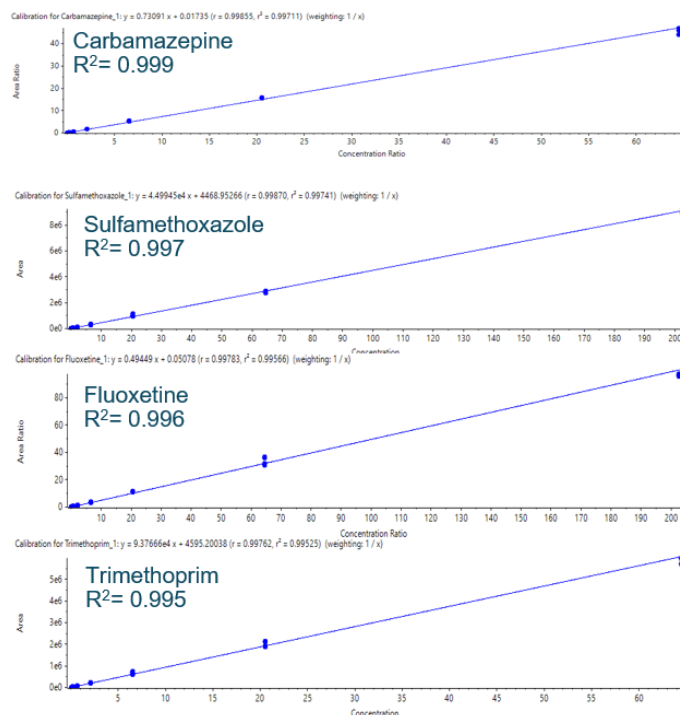


图. 样品校准曲线。对化合物的基质标准溶液进行分析，在0.07 ng/mL至200 ng/mL浓度范围内，具有良好的线性。

表4. 校准标准的准确度和精密度统计

| Calibration standard (ng/mL) | Carbamazepine | | Fluoxetine | | Sulfamethoxazole | | Trimethoprim | |
|------------------------------|---------------|------|------------|------|------------------|-------|--------------|-------|
| | %Acc | %CV | %Acc | %CV | %Acc | %CV | %Acc | %CV |
| 0.021 | 80.00 | 0.40 | - | - | - | - | - | - |
| 0.067 | 86.33 | 1.16 | 82.67 | 4.33 | 95.97 | 3.40 | 98.52 | 11.93 |
| 0.211 | 99.75 | 6.11 | 84.72 | 3.69 | 90.53 | 1.02 | 98.22 | 10.41 |
| 0.662 | 110.37 | 1.23 | 105.33 | 5.53 | 110.09 | 2.36 | 114.07 | 3.77 |
| 2.08 | 111.0 | 2.32 | 107.71 | 3.05 | 120.89 | 0.31 | 115.94 | 1.39 |
| 6.54 | 111.12 | 1.10 | 110.37 | 9.73 | 111.83 | 11.70 | 109.74 | 9.38 |
| 20.53 | 104.81 | 0.69 | 111.88 | 1.79 | 110.22 | 9.78 | 104.17 | 7.69 |
| 64.50 | 96.89 | 3.19 | 103.35 | 8.20 | 98.38 | 1.95 | 96.52 | 3.00 |
| 202.64 | - | - | 96.15 | 1.06 | 98.88 | 2.04 | - | - |

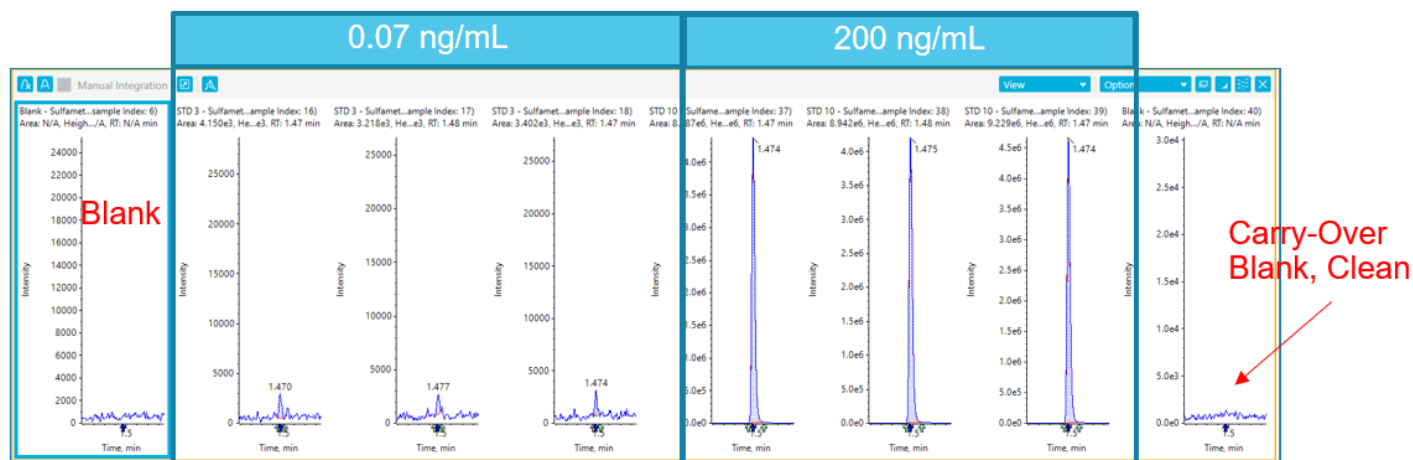


图4. LLOQ的提取离子色谱图（3次重复），检测最高浓度（3次重复），样品残留空白，使用磺胺甲恶唑（sulfamethoxazole）作为范例。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13147-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)