

应用纪要

使用Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪进行高灵敏度生物分析

Billy J. Molloy, Robert S. Plumb

Waters Corporation



摘要

使用Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪展示了可重现的高灵敏度UPLC-MS/MS生物分析方法。利用简单的蛋白沉

淀样品前处理方法检测柱上进样量低至250 ag (0.2 pg/mL)的咪达唑仑和丙咪嗪。该检测限还在三套单独的UPLC-MS/MS系统中得到重现。

优势

- 稳定、可重现的高灵敏度生物分析
- 样品前处理过程简单
- 使用行业前列的串联四极杆质谱仪以及新型UPLC技术
- 测量多套UPLC-MS/MS系统之间的精密度

简介

生物分析是药物发现和开发过程的关键组成部分，可提供有关药代动力学和剂量反应的信息。由于更强效的候选药物要求剂量更低，以及更多伦理驱动研究（减少、替代、完善）要求减少样本量，LC-MS方法的灵敏度变得日益重要。在满足这种更高灵敏度要求的同时，还需要在实验室之间无缝转移（无论在组织内部进行转移，还是转移至合同分析机构）。因此，除MS灵敏度外，仪器间重现性也很重要。

本应用纪要展示了在UPLC-MS/MS系统中使用Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪进行生物分析研究能够实现的可重现、稳定的灵敏度。使用基本的通用样品前处理技术（蛋白沉淀）检测基质样品（人血浆）中咪达唑仑和丙咪嗪的灵敏度限值低至250 ag（0.25飞克，柱上进样量）。该灵敏度水平在三套单独的UPLC-MS/MS系统中得到重现。还计算了两种化合物在所有系统上的仪器内和仪器间精密度，以便计算定量限。

实验

利用对照人血浆制备包含各种浓度咪达唑仑和丙咪嗪的校准曲线标样和QC样品。用50:50甲醇:水稀释各化合物的1 mg/mL甲醇溶液（购自Sigma Aldrich，英国），制备10 ng/mL混合储备液，将这些溶液用作加标溶液制备校准曲线和QC样品。利用三套单独的UPLC-MS/MS系统分析新制的校准曲线标样(0.2~100 pg/mL)和12个QC样品（4个0.2 pg/mL样品、4个0.4 pg/mL样品和4个1.0 pg/mL样品）。这些样品使用以下蛋白沉淀法制得：使用300 μ L乙腈沉淀100 μ L样品，在25,000 g下离心后，将上清液用去离子水按1:1的比例稀释。取10 μ L所得溶液注入UPLC-MS/MS系统。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class
检测器:	Xevo TQ-XS
样品瓶:	1 mL 96孔板
色谱柱:	ACQUITY, 2.1 × 50 mm, C ₁₈ , 1.7 μm
柱温:	55 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	10 μL
流速:	0.45 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸的水溶液 (含10 mM甲酸铵)
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度:	线性梯度: 流动相B在1.9 min内从25%增加至45%

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.45	75	25	6
1.9	0.45	55	45	6
2.0	0.45	2	98	6
2.6	0.45	2	98	6
2.7	0.45	75	25	6
3.2	0.45	75	25	6

质谱条件

质谱系统：	Xevo TQ-XS
电离模式：	ESI+
采集范围：	MRM通道： 咪达唑仑 - 326.1 > 291.0 (CV=60, CE=26) 丙咪嗪 - 281.1 > 86.0 (CV=30, CE=16)
毛细管电压：	0.5 kV
碰撞能量：	见上文
锥孔电压：	见上文

数据管理

色谱软件：	MassLynx 4.2版
质谱软件：	MassLynx 4.2版
信息学软件：	TargetLynx XS v4.2

结果与讨论

为评估该方法的实用灵敏度和重现性，使用3套单独的UPLC-MS/MS系统成功分析了校准曲线标样和QC样品。在连续几天内分析三次，批次大小和进样顺序在所有情况下都相同，包括前后含空白的校准曲线（0.2、0.4、1、5、10、50和100 pg/mL），随后按浓度递增顺序进样前后含空白的QC样品。这三套系统均将ACQUITY UPLC I-Class与Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪联用。两种目标分析物在通用色谱系统上得到充分保留，并实现了基线分离。咪达唑仑和丙咪嗪的保留时间分别为1.1 min和1.6 min。在所有三套系统上，两种分析物（咪达唑仑和丙咪嗪）的校准曲线在整个浓度范围(0.2~100 pg/mL)内均呈线性，使用1/x加权得到的 r^2 值高于0.99。使用所有三套LC-MS系统测得两种分析物的检测限均为0.2 pg/mL，最低浓度校准品和所有四个QC样品

在所有情况下均可检出（见图1）。计算每套系统上两种分析物浓度为0.2、0.4和1.0 pg/mL时的精密度(%CV)以确定这两种分析物的定量限。所有QC水平的平均计算浓度均精确至所有分析标称值的15%以内。结果测得丙咪嗪和咪达唑仑的定量下限(LLOQ)分别为0.4 pg/mL和1.0 pg/mL，两种情况下的总系统间精密度差别<8%。图2显示了每套系统中丙咪嗪的%CV随浓度的变化。

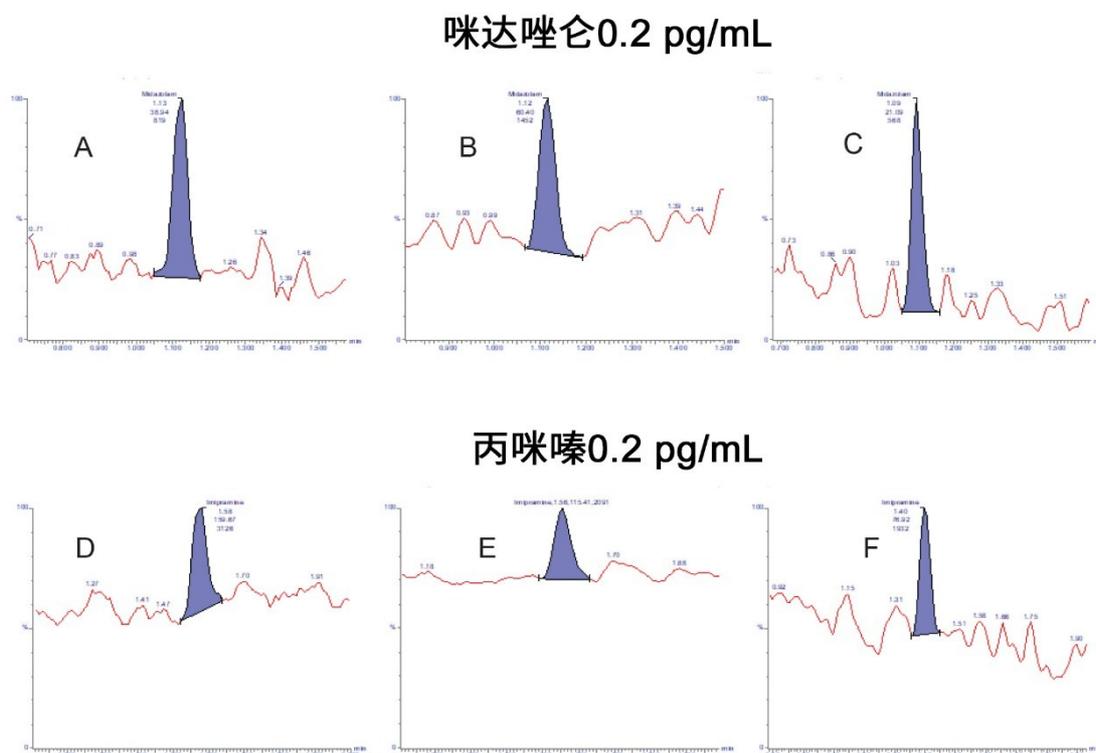


图1.UPLC-MS/MS色谱图，显示了检测限水平（0.2 pg/mL，柱上进样量250 ag）咪达唑仑和丙咪嗪的检测结果：A + D – 系统1，B + E – 系统2，C + F – 系统3。

丙咪嗪系统内精密度(%CV)

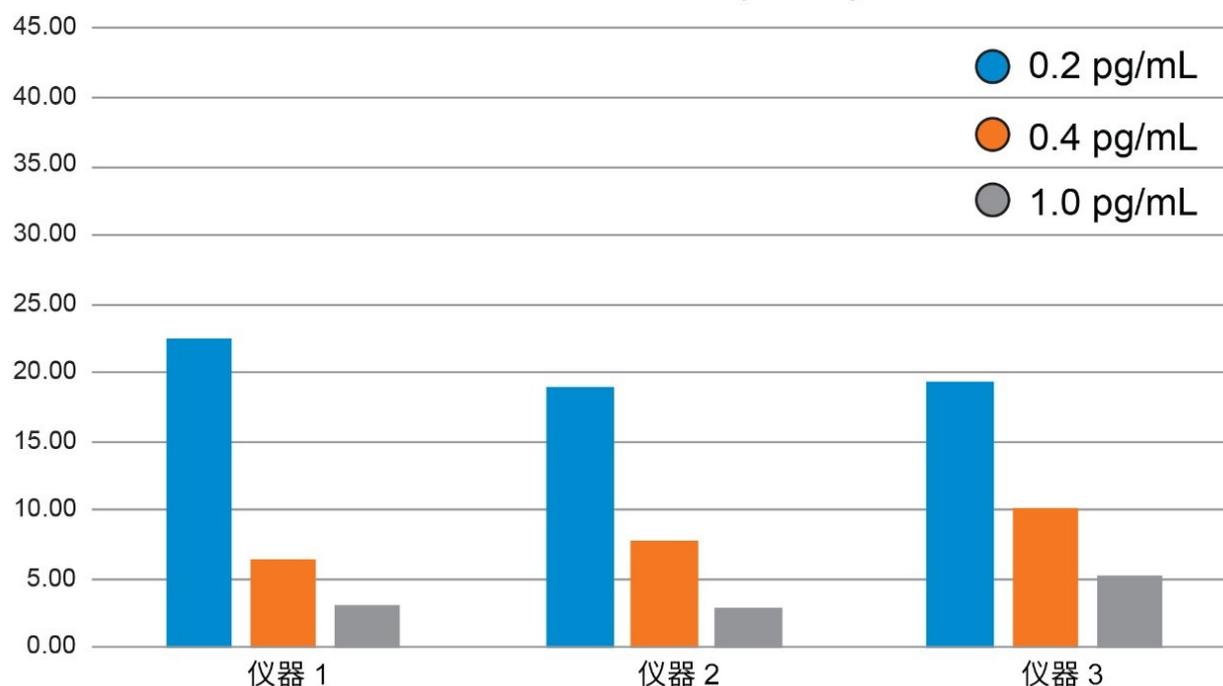


图2.在3台UPLC-MS/MS仪器上分析0.2、0.4和1.0 pg/mL丙咪嗪得到的系统内精密度(%CV)

结论

使用多台Xevo TQ-XS质谱仪结合ACQUITY UPLC I-Class，展示了一种用于定量分析人血浆中咪达唑仑和丙咪嗪的高灵敏度UPLC-MS/MS生物分析方法。该方法表现出非常高的灵敏度（柱上进样量250 ag），并且在不同系统之间具有良好的重现性。还计算了定量限和线性，同样在不同系统之间具有良好的重现性。

特色产品

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

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>>

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

720007208ZH, 2021年3月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.