

使用Waters™ Xevo™ TQ Absolute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

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

使用Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪展示了一种重现性好、灵敏度高的超高效液相色谱与串联质谱联用(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大鼠血浆中的咪达唑仑和丙咪嗪，柱上进样量为250 μ g。精密度和准确度数据分析表明，大鼠血浆中咪达唑仑和丙咪嗪的定量限为0.2 μ g/mL。

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
-

简介

生物分析是药物发现和开发过程的关键组成部分，可提供有关新化学实体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（3R：减少(reduce)、替代(replace)、完善(refine)）要求减少样本量，液相色谱-质谱联用(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。

本应用纪要证明，在UPLC-MS/MS系统中使用Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪进行生物分析研究能够发挥可重现、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（大鼠血浆）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）。经证明，这一灵敏度水平可重现且稳定，两种化合物的定量限均为0.2 g/mL。

实验

利用对照大鼠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质量控制(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标样和QC样品。制备一系列新鲜的校准曲线标样(0.2–100 pg/mL)和12个QC样品（4个0.2 pg/mL、4个0.4 pg/mL、4个1.0 pg/mL），使用Xevo TQ Absolute进行分析。这些样品采用蛋白沉淀法制备，方法如下：使用300 μ L乙腈通过漩涡混合沉淀100 μ L样品。在25000 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。在ACQUITY UPLC 2.1 x 50 mm BEH C₁₈ 1.7 μ m色谱柱上分离样品，流动相A为含10 mm甲酸铵和0.1%甲酸的水溶液，流动相B为0.1%甲酸的乙腈溶液，使用反相梯度运行1.9分钟。在多重反应监测模式(MRM)下运行正离子ESI质谱分析，监测流动相洗脱液。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统
检测：	Xevo TQ Absolute
样品瓶：	1 mL 96孔板
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 色谱柱, 130 Å, 1.7 μ m, 2.1 mm x 50 mm, 1根/包

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 Absolute

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™ v4.2

质谱软件: MassLynx v4.2

信息学软件: TargetLynx™ XS v4.2

结果与讨论

为评估方法的灵敏度和重现性，使用由ACQUITY UPLC I-Class和Xevo TQ Absolute组成的UPLC-MS/MS系统成功分析了校准曲线标样和QC样品。批次和进样顺序如下：校准曲线标样（0.2、0.4、1、5、10、50和100 pg/mL），前后使用空白血浆样品；随后是QC样品（0.2、0.4和1.0 pg/mL，n=4），按浓度递增顺序进样，前后使用空白血浆样品。两种目标分析物在反相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和1.5分钟。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。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）。计算两种分析物在0.2、0.4和1.0 pg/mL浓度下的精密度(%CV)，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两个分析标称值的15%以内。结果测得丙咪嗪和咪达唑仑的定量下限(LLOQ)均为0.2 pg/mL，精密度均<11%。图2显示了在0.2、0.4和1.0 pg/mL浓度水平下观察到的丙咪嗪和咪达唑仑的变异系数。

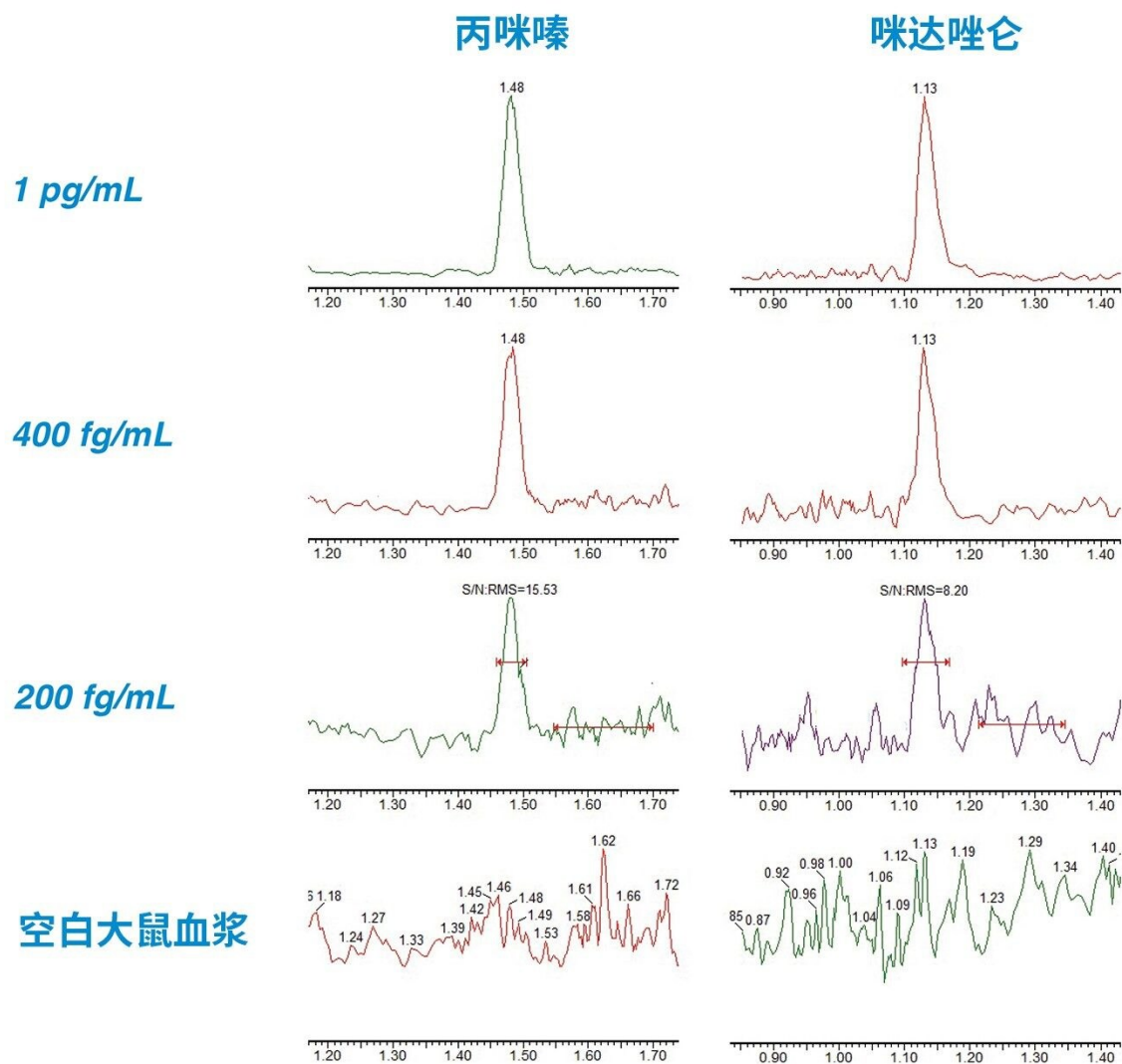


图1.

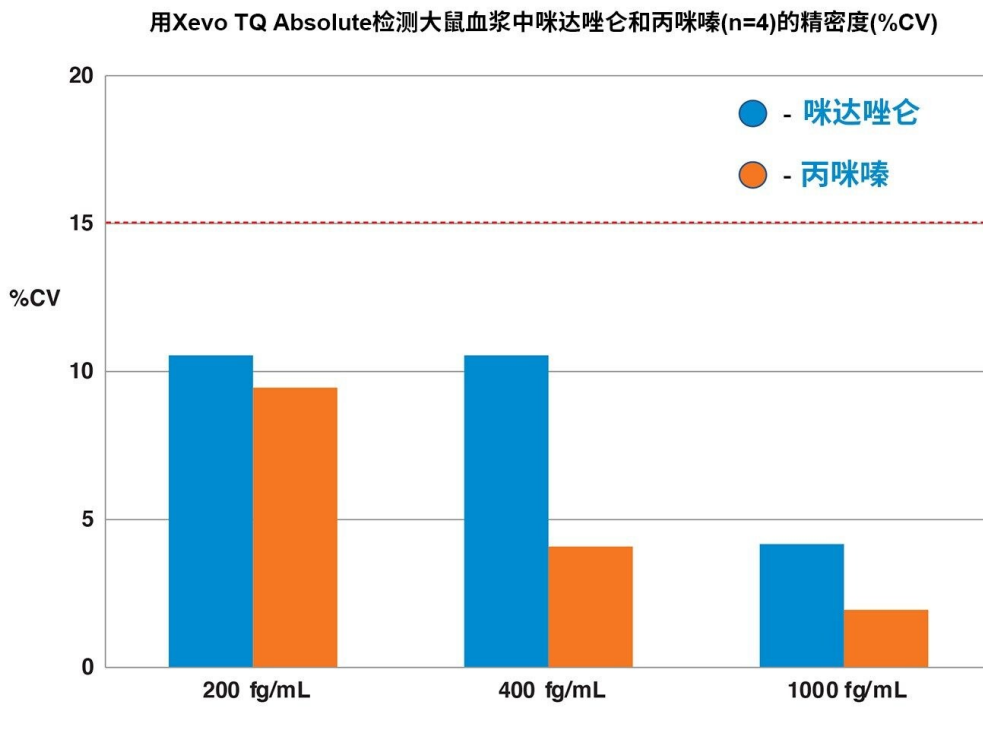


图2.

结论

本研究使用Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪与ACQUITY UPLC I-Class PLUS联用系统展示了一种定量分析大鼠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。研究结果表明，该方法具有非常高的灵敏度（柱上进样量250 ag），计算出的定量限、线性和精密度也表明该方法具有出色的灵敏度、线性和重现性。

特色产品

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

Xevo TQ Absolute <[nextgen/cn/zh/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html](https://www.waters.com/nextgen/cn/zh/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html)>

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

[TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720007563ZH, 2022年3月



© 2024 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](#)