

液相色谱-串联质谱生物分析方法的 基质效应和对策

刘晓云, 陈笑艳, 钟大放

(中国科学院上海药物研究所药物代谢研究中心, 上海 201203)

摘要:液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法具有高灵敏度、高选择性、高通量等特点,已经成为生物分析的主流方法,广泛应用于新药发现和开发过程中新化学实体及其代谢物的定量分析。然而,由于生物样品基质成分复杂,共洗脱物质会影响分析物的离子化,使分析物的质谱响应增加或降低,从而影响LC-MS/MS分析方法的准确度和精密度。一般而言,离子抑制较离子增强更为常见。因此,在建立LC-MS/MS法时,需要对离子抑制进行评估和校正,并采用不同的策略消除或减少基质效应的影响。本文综述了生物样品分析中基质效应的来源和评估方法,重点介绍了克服基质效应的策略。引起基质效应的物质包括磷脂、盐类、尿素、代谢物等内源性物质和赋形剂、抗凝剂、固定相释放物质及降解产物等外源性物质。目前基质效应的评价方法主要有提取后加入法和柱后灌注法。克服基质效应的策略主要有使用稳定同位素内标,将极性药物衍生化,沉淀蛋白后稀释上清液,优化样品预处理方法、色谱和质谱条件等。结合本课题组的应用实例,重点阐述了建立LC-MS/MS生物分析方法时,为减少基质效应遇到的困难及解决方法。

关键词:液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS);药动学;基质效应

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2017)04-0388-12

doi:10.7538/zpxb.2016.0214

Matrix Effects and Countermeasure of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Bioanalysis

LIU Xiao-yun, CHEN Xiao-yan, ZHONG Da-fang

(Center for Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shanghai Institute of Materia Medica,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method has the characteristics of high sensitivity, high selectivity and high throughput, and has become the mainstream approach for bioanalytical assays. It is widely used for the quantitative analysis of new drug entities (NCEs) and their metabolites in the discovery and development of new drugs. However, due to the complex composition of the biological sample matrix, the co-eluting material affects the ionization of the analyte, result in

收稿日期:2016-12-31;修回日期:2017-03-07

基金项目:国家自然科学基金(81373479, 81521005)资助

作者简介:刘晓云(1992—),女(汉族),福建人,硕士研究生,药物分析专业。E-mail: 201528012342040@simmm.ac.cn

通信作者:钟大放(1957—),男(汉族),吉林人,研究员,从事药物代谢动力学研究。E-mail: dfzhong@simmm.ac.cn

increases or decreases the mass spectral response of the analyte, thus affecting the accuracy and precision of the LC-MS/MS analysis method. In general, ion suppression is more common than ion enhancement. When the analytical method is established, if the ion suppression is not evaluated and corrected, the sensitivity of the analytical method will be seriously affected. Therefore, it is important to assess the matrix effect and use different strategies to eliminate or reduce the impact of matrix effects. In this paper, an overview was provided, including how matrix effect occurs, outline the methodologies used to assess the matrix effect in biological sample analysis and discuss the strategy of overcoming the matrix effect. Substances that cause matrix effects include endogenous substances and exogenous substances. Endogenous substances include phospholipid, salts, urea, metabolites and so on. Exogenous substances such as excipients, anticoagulants, stationary phase release materials and degradation products. At present, there are mainly two method to assess the matrix effect, one is post-extraction spike, the other is post-column infusion. The strategies to overcome the matrix effect including the use of stable-isotope labeled internal standard, derivatization of polar drugs, dilute the supernatant after precipitation of the protein, optimize sample pretreatment method, the chromatographic conditions and the mass spectrometry conditions. This paper provides examples of the application of our laboratory, focusing on the difficulties encountered and solutions in the establishment of LC-MS/MS analysis methods.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); pharmacokinetics; matrix effect

液相色谱-串联质谱技术(LC-MS/MS)于20世纪90年代发展成熟,在灵敏度、选择性、分析通量以及对药物分析的适用性等方面有非常突出的优势,特别适用于复杂基质(如血浆)中微量药物及代谢物的定量分析,是近20年来生物分析的主流技术。然而,基质效应是该技术用于生物样品定量分析中最突出的问题。在分析过程中,共洗脱物质会影响分析物的离子化,这种现象称为基质效应。基质效应分为离子抑制和离子增强,离子抑制使分析物的质谱响应降低,而离子增强则使分析物的质谱响应增加。一般而言,离子抑制较离子增强更易发生。基质效应会影响分析物的检出限、定量限、线性、准确度和精密度,严重干扰了生物样品的定量分析。因此,在建立LC-MS/MS生物分析方法时,应对基质效应进行评估,并采取适宜的方法消除或减少基质效应的影响,从而确保数据的可靠性。

本工作根据课题组近年来从事药代动力学研究的经验,综述LC-MS/MS分析测定中基质效应的来源、评估方法、克服基质效应的策

略,并通过研究实例加以阐述,希望为克服LC-MS/MS生物分析方法的基质效应提供参考。

1 基质效应的来源和评估方法

采用LC-MS/MS分析测定时,生物样品中的内源性物质或外源性物质会影响分析物的离子化或去溶剂化过程,使分析物的质谱响应增加或降低,从而产生基质效应。内源性物质是样品基质的一部分,如蛋白质、磷脂、盐类等;外源性物质可能是色谱系统中的一部分,如缓冲液,或在样品预处理过程中引入的物质,如塑化剂^[1]。研究发现,磷脂是产生基质效应的主要内源性物质,它能够严重抑制许多化合物的质谱响应,且较难从生物样品中去除^[2-4]。在生物基质中,主要有甘油磷脂和鞘磷脂两种类型的磷脂,前者包括卵磷脂、溶血卵磷脂、磷脂酰乙醇胺等,在不同受试者和不同采样时间点时,它们的浓度差别很大。在大部分人的血浆和尿液中,最常见的磷脂类型为卵磷脂^[5]。

检测和评估基质效应主要有提取后添加法

和柱后灌注法。提取后添加法以内标归一化的基质因子定量基质效应,在相同浓度下,通过计算存在基质时(由空白基质提取后加入分析物)与不含基质时(分析物的纯溶液)分析物信号的比值来获得基质因子。若基质因子大于1,说明存在离子增强;若基质因子小于1,说明存在离子抑制。用分析物的基质因子除以内标的基质因子来计算内标归一化的基质因子^[6]。柱后灌注法主要用于定性评估基质效应,具体流程示于图1^[7]。通过注射泵将分析物的标准溶液注入,然后经T形管引入到色谱柱流出液中;将空白基质样品注入系统(同时连续灌注分析物),并使用开发的分析方法在色谱柱上分离空白基质样品;若分析物的基线信号下降(信号抑制)或升高(信号增强),说明存在基质干扰。

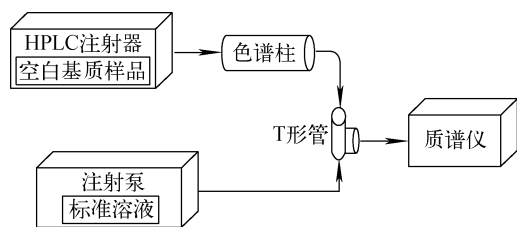


图1 柱后灌注实验的设置示意图

Fig. 1 Schematic of the set-up of a post-column infusion experiment

2 克服基质效应的策略

2.1 使用稳定同位素内标

内标与分析物暴露在相同的基质成分中,使用分析物与内标的响应比值进行定量可以校正可能存在的基质效应,减少分析过程中基质效应的影响。对于LC-MS/MS法而言,稳定同位素内标(SIL-IS)是最合适的。SIL-IS是由分析物分子中的原子被它们的稳定同位素,如 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 取代后获得的。SIL-IS在样品预处理、色谱分离、质谱离子化和裂解过程中,与分析物几乎一致。因为SIL-IS与分析物的保留时间很接近,基质对它们的影响是相同的,所以使用SIL-IS是克服基质效应最简便的方法。但合成SIL-IS的难度较大,尤其是对多个分析物同时定量时,需要多个相应的SIL-IS。

选择合适的SIL-IS的主要标准有:1)该

同位素异构体与生物样品提取物中天然存在的同位素异构体重叠最小;2)内标的同位素纯度尽可能高^[8]。

本课题组使用稳定同位素内标的LC-MS/MS生物分析方法进行的部分分析实例列于表1^[9-23],其中SIL-IS既可通过商业途径购买,也可自行合成。经验表明,使用稳定同位素内标是校正基质效应最有效的手段。

2.2 将强极性药物衍生化

极性药物结构中一般含有强极性基团,如胍基、核苷、氨基酸、糖和磷酸,它们在常用的反相色谱柱中保留较差。使用ESI离子源时,分析物可能会与内源性物质一起流出,造成严重的基质效应,并降低灵敏度^[24]。因此,需要改善极性药物在色谱柱上的保留,将分析物与内源性物质分离。柱前衍生化是分析极性药物的重要手段,通过衍生化可以改善极性药物的色谱行为和质谱响应。本课题组开发的柱前衍生化LC-MS/MS生物分析方法列于表2。

具有双磷酸结构的抗骨质疏松药物,如阿仑膦酸、米诺膦酸等广泛应用在临床上。这类药物的极性非常强,在液相色谱柱上不保留,所以在LC-MS/MS分析前须进行衍生化。阿仑膦酸与三甲基硅烷化重氮甲烷(TMS-DAM)的衍生化反应示于图2a^[13],其中,TMS-DAM是衍生化试剂,甲醇作为催化剂。衍生化产物包括六甲基化衍生物和七甲基化衍生物,通过优化反应条件,使得反应主要生成七甲基化衍生物。通过测试一系列衍生化温度和反应时间,最终确定衍生化条件为室温下反应30 min。需要注意的是,极性药物容易发生不可逆吸附。阿仑膦酸的衍生物在玻璃表面也会发生吸附,所以样品预处理中使用的玻璃器皿需要提前使用六甲基二硅氮烷进行硅烷化。通过衍生化改善了阿仑膦酸的色谱行为,且衍生化后的结构中含有季铵阳离子,大大提高了质谱响应。

米诺膦酸(MA)是高效的含氮二膦酸盐,给药剂量低、血药峰浓度低。由于米诺膦酸含有强极性的磷酸基团,建立定量下限为ng/L水平的分析方法具有挑战性。采用固相萃取将米诺膦酸与内源性成分分离后,再使用衍生化试剂TMS-DAM将其衍生化,生成五甲基化米诺膦酸(PMMA),获得定量下限为10 ng/L的

表 1 使用稳定同位素内标的 LC-MS/MS 生物分析方法举例

Table 1 Examples of LC-MS/MS bioanalytical method using a stable-isotope labeled internal standard

分析物 Analyte	内标 Internal standard	内标来源 Source	预处理 Pretreat- ment	质谱仪型号 MS instrument	电离方式 Ionization	线性范围 Linearity/($\mu\text{g/L}$)
阿托伐他汀(AT) ^[9]	d ₅ -AT	加拿大 TRC 公司	LLE	AB Sciex 6500	ESI(+)	0.0200~15.0(AT/ <i>o</i> -OAT)
邻羟基阿托伐他汀(<i>o</i> -OAT)	d ₅ - <i>o</i> -OAT	加拿大 TLC 公司				0.0100~2.00(<i>p</i> -OAT)
对羟基阿托伐他汀(<i>p</i> -OAT)	d ₅ - <i>p</i> -OAT	加拿大 TLC 公司				
卡培他滨(Cape) ^[10]	d ₁₁ -卡培他滨	加拿大 TLC 公司	PPT	API 4000	ESI(+)	10.0~5000(Cape/DFCR/DFUR)
5'-脱氧-5-氟胞嘧啶核苷(DFCR)	¹³ C, ¹⁵ N ₂ -DFCR	加拿大 TLC 公司			ESI(-)	2.00~200(5-FU)
5'-脱氧-5-氟尿嘧啶核苷(DFUR)	¹³ C, ¹⁵ N ₂ -5-FU	加拿大 TLC 公司				
5-氟尿嘧啶核苷(5-FU)						
丁苯酞(NBP) ^[11]	d ₄ -NBP	本实验室制备	LLE	Agilent 6460	ESI(+)	5~400
丁苯酞(NBP) ^[12]	d ₄ -NBP	本实验室制备	PPT	Agilent 6460	ESI(+)	3~800(NBP/M2)
10-酮-丁苯酞(M2)	d ₄ -M2	本实验室制备			ESI(-)	3~2400(M3-1/M3-2/M5-2)
10-羟基丁苯酞(M3-1/M3-2)	d ₄ -M3-1	本实验室制备				
丁苯酞-11-羧酸(M5-2)	d ₄ -M3-2	本实验室制备				
	d ₄ -M5-2	本实验室制备				
阿仑膦酸 ^[13]	d ₆ -阿仑膦酸	加拿大 TRC 公司	SPE	API 4000	ESI(+)	1~1 000
米诺膦酸 ^[14]	d ₄ -米诺膦酸	加拿大 TLC 公司	SPE	AB Sciex 6500	ESI(+)	0.01~1
吗啉硝唑 ^[15]	d ₄ -吗啉硝唑	本实验室制备	LLE	API 4000	ESI(+)	5~6000
奥硝唑 ^[16]	d ₅ -奥硝唑	本实验室制备	LLE	Agilent 6460	ESI(+)	30~10000
奥硝唑 ^[17]	d ₅ -奥硝唑	本实验室制备	PPT	Agilent 6460	ESI(+)	100~30000(奥硝唑)
2',3'-环氧奥硝唑(M3)	d ₅ -M3	本实验室制备				10~3000(M3)
2',3'-二羟基奥硝唑(M6)	d ₅ -M6	本实验室制备				5~200(M6)
奥硝唑葡萄糖醛化物(M16-1)						3~900(M16-1/M16-2)
奥硝唑葡萄糖醛化物(M16-2)						

续表 1

分析物 Analyte	内标 Internal standard	内标来源 Source	预处理 Pretreat- ment	质谱仪型号 MS instrument	电离方式 Ionization	线性范围 Linearity/($\mu\text{g/L}$)
组胺 ^[18] 布地奈德 ^[19]	d ₄ -组胺	德国 J&K 公司	PPT	Xevo TQ-S MS	ESI(+)	0.2~500
	d ₈ -布地奈德	加拿大 TLC 公司	LLE	AB Sciex 5500	ESI(-)	0.005~0.5(R 构型) 0.005~3(S 构型)
匹可硫酸(PICO) ^[20]	d ₁₂ -PICO	加拿大 TRC 公司	PPT	AB Sciex 5500	ESI(+)	0.150~40.0(PICO-Na/M2) 0.600~160(BHPM) 0.045~12.0(M1)
匹可硫酸苷元(BHPM)	d ₁₂ -BHPM	加拿大 TRC 公司				
BHPM 单葡萄糖醛化物(M1)	d ₁₂ -M1	本实验室制备				
BHPM 单硫酸化物(M2)	d ₁₂ -M2	本实验室制备				
非布司他 ^[21]	d ₇ -非布司他	加拿大 TLC 公司	PPT	Agilent 6460	ESI(+)	10~5000
奥替拉西 ^[22]	¹³ C ₂ , ¹⁵ N ₃ -奥替拉西	加拿大 TRC 公司	LLE	API 4000	APCI(+)	2~150
SS-20 ^[23]	d ₁₀ -SS-20	康肽德生物医药技术 (上海)有限公司	SPE	Thermo Finnigan TSQ	ESI(+)	0.3~10000

表 2 柱前衍生化液相色谱-串联质谱法分析生物样品中的极性药物
Table 2 LC-MS/MS bioanalysis for polar drug with pre-column derivatization

分析物 Analyte	衍生化试剂 Derivatization reagent	预处理 Pretreatment	质谱仪型号 MS instrument	电离方式 Ionization	线性范围 Linearity/($\mu\text{g/L}$)
阿仑膦酸 ^[13]	三甲基硅烷化重氮甲烷	SPE	API 4000	ESI(+)	1~1000
米诺膦酸 ^[14]	三甲基硅烷化重氮甲烷	SPE	AB Sciex 6500	ESI(+)	0.01~1
三七素 ^[25]	10 mol/L 盐酸-甲醇(10 : 90, V/V)	PPT	Thermo Finnigan TSQ API II	APCI(+)	20~50000
厄多司坦代谢物 M1 ^[27]	2-溴-3'-甲氧基苯乙酮	PPT	Agilent 6460	ESI(+)	5~10000
奥替拉西 ^[22]	4-溴乙基-7-甲氧基香豆素	LLE	API 4000	APCI(+)	2~150

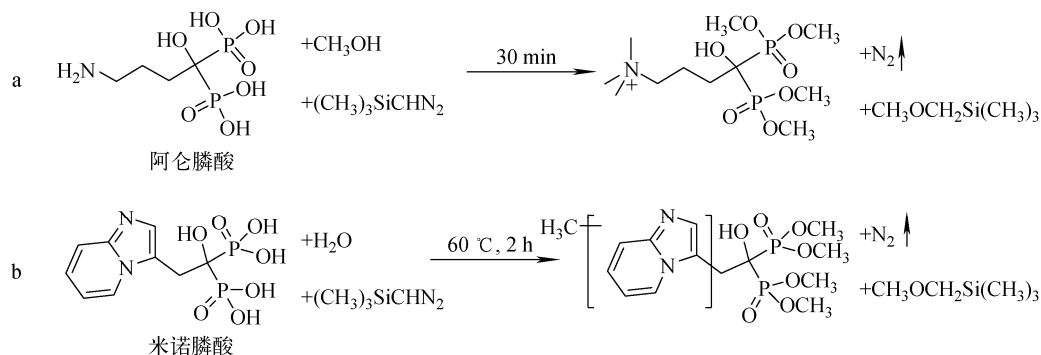


图2 阿仑膦酸(a)、米诺膦酸(b)与三甲基硅烷化重氮甲烷的衍生化反应

Fig. 2 Derivative reactions of alendronate acid (a) and minodronic acid (b) with trimethylsilyldiazomethane

LC-MS/MS 分析方法^[14]。米诺膦酸与 TMS-DAM 的衍生化反应示于图 2b, 其中, TMS-DAM 作为衍生化试剂, 水作为催化剂。实验发现, 稳定同位素内标 d_4 -米诺膦酸的衍生化效率比米诺膦酸低, 且差异较大, 方法的线性和重复性较差。实验通过延长米诺膦酸和内标与衍生化试剂在固相萃取柱上的暴露时间, 提高了 d_4 -米诺膦酸的衍生化效率。通过优化衍生化条件, 可使 PMMA 和 d_4 -PMMA 衍生化反应的产率接近 100%。EDTA 可以防止米诺膦酸与内源性金属离子形成复合物, 使用 EDTA 作为抗凝剂时, 可以促进衍生化并提高重现性。

三七素是非蛋白氨基酸, 衍生化后可以显著增强信号强度, 并增加其在色谱柱上的保留时间, 从而避免基质效应的影响^[25]。三七素与甲醇的酯化反应示于图 3, 其中, 甲醇作为衍生化试剂, 盐酸作为催化剂。反应生成单甲酯衍生物或双甲酯衍生物, 双甲酯衍生物的质谱响应比单甲酯衍生物高。实验考察了反应温度(65 °C 和 70 °C)和反应时间(10、20、30 min)对衍生化效率的影响。结果表明, 升高温度和延长反应时间都能促进双甲酯衍生物的生成。结合三七素的稳定性, 最终确定反应条件为 70 °C 下反应 20 min。通过衍生化, 三七素的信号强

度增加了 50 倍。

厄多司坦在临床上用作黏痰溶解剂, 其结构上有巯基内酯环, 在体内经肝脏代谢生成含有游离巯基的活性代谢物 M1, 从而发挥抗氧化活性^[26]。游离巯基极易被氧化, 形成二硫键。代谢物 M1 分子极性大, 较难在普通的反相柱上保留, 基质效应大。因此采用还原剂二巯苏糖醇(DTT)与血浆样品进行孵化, 游离出 M1 分子内巯基, 再用 2-溴-3'-甲氧基苯乙酮(MPB)衍生化试剂对游离巯基进行衍生化, 反应示于图 4^[27]。实验对衍生化温度、时间、反应 pH 值、DTT 和 MPB 用量等条件进行了优化, 结果表明, 通过对 M1 进行衍生化, 可改善其在色谱上的保留, 克服基质效应的影响。

抗肿瘤药奥替拉西在 ESI⁻ 模式下具有良好的质谱响应, 但是色谱峰的峰形和对称性较差, 因此使用化学衍生化方法改善其色谱行为^[22]。奥替拉西的衍生化反应示于图 5。奥替拉西先与盐酸在 60 °C 孵化 20 min, 以脱去羧酸; 随后与衍生化试剂 4-溴乙基-7-甲氧基香豆素在 60 °C 孵化 1 h。经过衍生化, 降低了奥替拉西的极性, 改善了色谱行为。由于衍生化产物包含了奥替拉西的大部分结构, 使得质谱检测具有特异性, 降低了内源性物质的干扰。

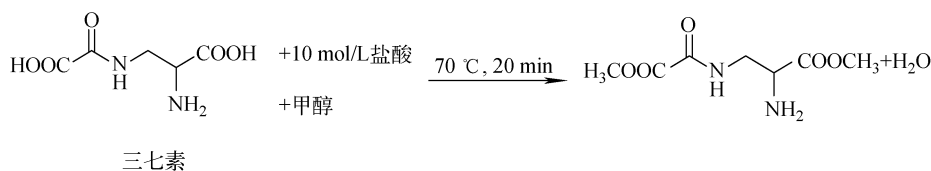


图3 三七素与甲醇的衍生化反应

Fig. 3 Derivative reaction of dencichine with methanol

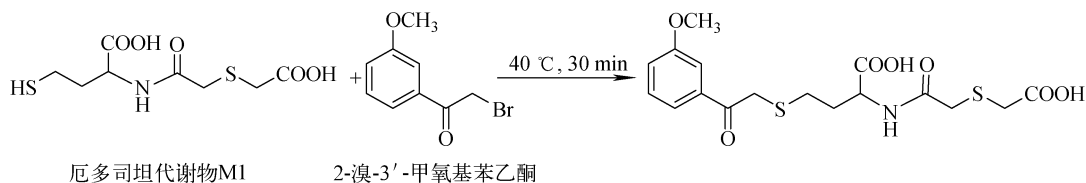


图4 厄多司坦代谢物 M1 与 2-溴-3'-甲氧基苯乙酮的衍生化反应

Fig. 4 Derivative reaction of erdosteine metabolite M1 with 2-bromine-3'-methoxyacetophenone

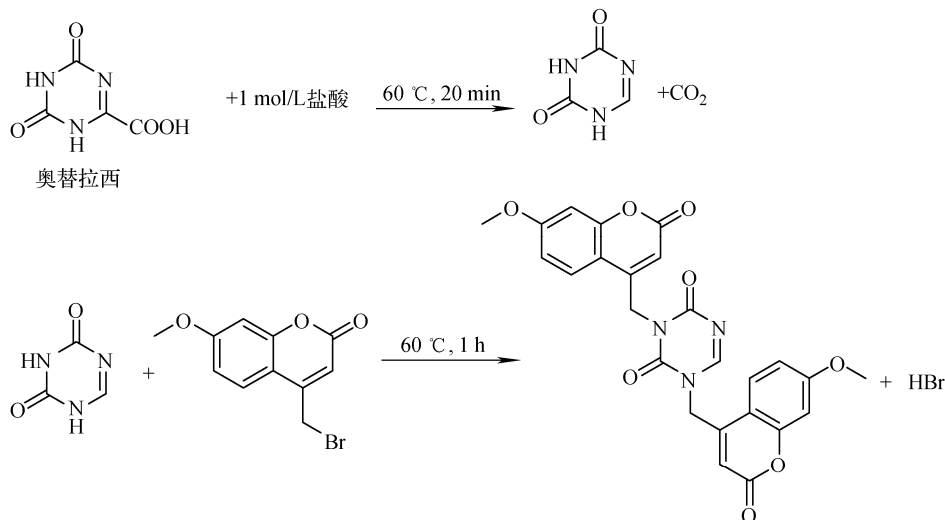


图5 奥替拉西脱羧后使用 4-溴乙基-7-甲氧基香豆素进行衍生化

Fig. 5 Derivative reaction of oxonic acid decarboxylation product with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin

2.3 沉淀蛋白后稀释上清液

在 LC-MS/MS 生物分析中,蛋白沉淀法(PPT)具有简便快速的特点,PPT 结合 96 孔板可以实现高通量和自动化的样品预处理。然而,PPT 不能去除盐类及其他内源性物质,如脂类、磷脂和脂肪酸,因此有较明显的基质效应^[28]。稀释是最基本的样品预处理方法,适用于对样品稀释后,分析物响应降低幅度低于基质效应降低幅度的情况,一般用于分析方法对检测限要求较低或分析物浓度较高的情况。为了减少基质效应,可以将 PPT 与稀释相结合,以获得更干净的样品提取物。

采用 LC-MS/MS 法同时测定人血浆中阿帕替尼和 4 个主要代谢物时,使用乙腈沉淀蛋白后,取上清液与流动相按体积比 1 : 2 进行稀释^[29]。采用 LC-MS/MS 法同时测定人血浆中氟马替尼和 2 个主要代谢物时,使用甲醇沉淀蛋白后,将上清液与流动相按体积比 3 : 2 进行稀释^[30]。采用 LC-MS/MS 法同时测定人血浆

中雷诺嗪及 3 个主要代谢物时,使用乙腈沉淀蛋白后,将上清液与水按体积比 1 : 2 进行稀释^[31]。此外,在头孢他啶和他唑巴坦^[32]、拉米夫定^[33]的 LC-MS/MS 分析方法中,也采用沉淀蛋白后稀释上清液的预处理方法。

2.4 其他策略

2.4.1 优化预处理方法

样品预处理的目的是包括:将分析物与基质成分分离,对分析物进行预浓缩,使样品溶液与 LC-MS/MS 系统兼容。传统上,液-液萃取(LLE)、固相萃取(SPE)和蛋白沉淀法(PPT)是生物分析中最常见的 3 种样品预处理技术。当基质效应较为明显时,优先选择 LLE,其次为 SPE,因为这两种预处理技术能够获得较为干净的提取物。

磷脂去除板是较新的样品预处理方法,其结合了沉淀蛋白及固相萃取技术,能够选择性地沉淀蛋白,并去除磷脂。市场上已有一些不同类型的磷脂去除板,如沃特世的 Ostro 96 孔磷脂去除板、菲罗门的 Phree 96 孔磷脂去除板、安捷伦的

Captiva ND 过滤板、西格玛奥德里奇的混合型固相萃取 96 孔板等。与蛋白沉淀相比,这些板可以有效地除去样品中的磷脂^[34]。

2.4.2 优化色谱条件 优化色谱条件是为了将分析物与干扰物质分离,从而降低或减少基质效应。对于强极性化合物的生物分析,除了采用衍生化方法外,还可以通过优化色谱条件来减少或避免基质效应。亲水相互作用色谱(HILIC)是一种以极性材料为固定相(硅胶或衍生化硅胶),高比例有机相和低比例水相为流动相体系的色谱,分析物的保留时间随着极性的增强而增加。因此,可以使用 HILIC 定量分析血浆样品中内源性物质和药物,HILIC 色谱柱的选择及样品预处理已有详细的报道^[35]。

除了改变色谱柱的类型外,还可以通过降低液相色谱洗脱液的流速、改变洗脱液的组成、利用梯度洗脱将分析物与干扰物质分离以及将两种不同类型的色谱柱串联等方法来克服基质效应的影响^[8]。

2.4.3 优化质谱条件 电喷雾电离(ESI)是 LC-MS/MS 分析方法中应用最为广泛的离子化技术,由于不同离子源的离子化原理不同,它们受基质干扰的程度也不同。一般认为,ESI 较大气压化学电离(APCI)和大气压光电离(APPI)更容易受基质效应的干扰。

降低离子源的进样速度能够显著地降低基质效应,在低流速条件下,离子化效率显著提高,减少了干扰物质进入离子源,从而减少了化学背景^[36]。

3 应用实例

3.1 LC-MS/MS 法同时测定人血浆中阿托伐他汀及其代谢物

阿托伐他汀(AT)能够降低胆固醇和低密

度脂蛋白,临床上用于高脂血症病人预防心血管疾病,在体内主要由肝脏的 CYP3A4 酶代谢为邻羟基阿托伐他汀(*o*-OAT)和对羟基阿托伐他汀(*p*-OAT)两个活性代谢产物^[37],其结构式示于图 6。

为了克服基质效应,对样品预处理方法进行优化,最终确定为盐析辅助液-液萃取(SALLE)。结合稳定同位素内标 d_5 -AT、 d_5 -*o*-OAT、 d_5 -*p*-OAT 的使用,建立了同时定量测定人血浆中 AT、*o*-OAT 和 *p*-OAT 的分析方法,其定量下限分别为 0.020 0、0.020 0 和 0.010 0 $\mu\text{g/L}$ ^[9]。

在优化样品预处理条件时主要考虑两个因素:1) 样品预处理方法需简单快速,因为他汀类药物在体内外会发生羧基和酯基的相互转化,从而影响定量的准确性;2) 需要使用选择性较高的预处理方法,从而减少基质效应。

PPT 具有简单、快速的优点,但是选择性差,需要较长的色谱分离时间除去内源性干扰。LLE 和 SPE 能够提供较为干净的提取物,但是操作较为复杂、耗时,他汀类药物容易发生羧基和酯基的相互转化。SALLE 与 LLE 和 SPE 相比,具有操作步骤更少、萃取时间更短、回收率更高等优点。此外,使用 SALLE 能够获得与 LLE 和 SPE 同等干净的提取物,减少了基质效应的影响。该方法具有简便、灵敏、高效的特点,已成功地应用于阿托伐他汀的生物等效性研究。24 名健康志愿者单次口服 20 mg 参比试剂和受试试剂后,AT、*o*-OAT 和 *p*-OAT 的平均药时曲线示于图 7^[9]。

3.2 LC-MS/MS 法同时测定人血浆中奥硝唑及其主要代谢物

奥硝唑是 5-硝基咪唑衍生物,从 20 世纪 70 年代开始应用于预防和治疗厌氧菌感染^[38]。奥硝唑在体内的主要代谢物有 2',3'-环氧奥硝唑(M3)、2',3'-二羟基奥硝唑(M6)和奥

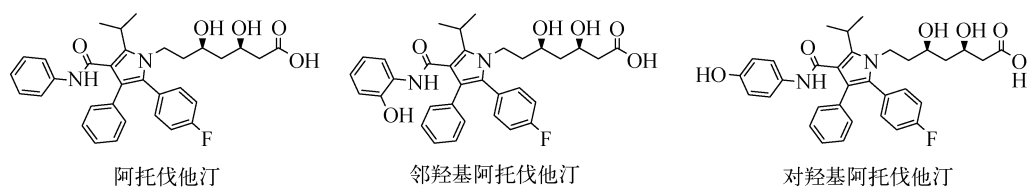
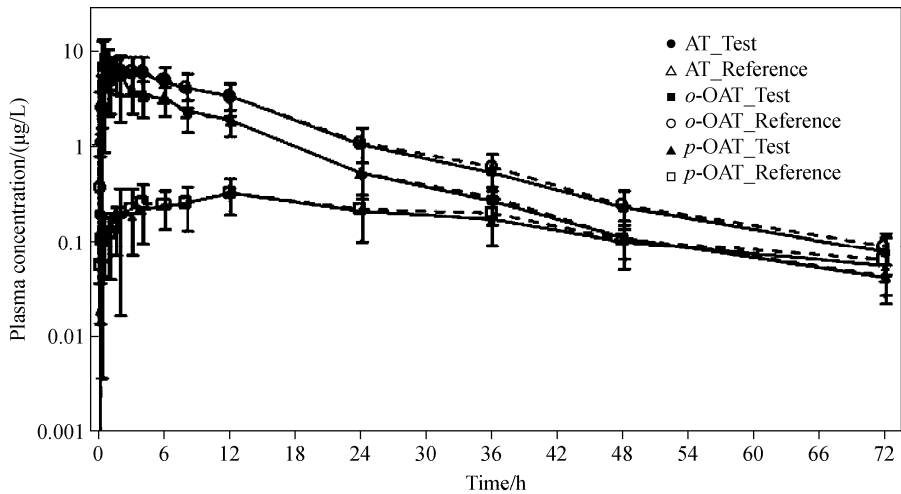


图 6 阿托伐他汀、邻羟基阿托伐他汀和对羟基阿托伐他汀的结构式

Fig. 6 Chemical structures of atorvastatin, *o*-hydroxyatorvastatin and *p*-hydroxyatorvastatin



注:数据为均值±标准差

图 7 24 名健康志愿者单次口服 20 mg 参比试剂和受试试剂后，阿托伐他汀、邻羟基阿托伐他汀和对羟基阿托伐他汀的平均药时曲线

Fig. 7 Mean plasma concentration-time curves of AT, *o*-OAT, *p*-OAT after 20 mg oral administration of test formulation and a reference formulation to 24 healthy volunteers

硝唑葡萄糖醛酸化物(M16-1 和 M16-2),其中,M3 和 M6 是活性代谢物,M16-1 和 M16-2 是非对映异构体。葡萄糖醛化是奥硝唑的主要代谢途径,也是造成对映体选择性药代动力学的主要原因^[39]。因此,需要对人血浆中奥硝唑及代谢物 M3、M6、M16-1 和 M16-2 进行同时定量分析。

在 LC-MS/MS 法同时测定人血浆中奥硝唑及其主要代谢产物(M3、M6、M16-1、M16-2)

时,采用简单的蛋白沉淀法,使用稳定同位素内标对基质效应进行校正,获得奥硝唑、M3、M6、M16-1 和 M16-2 的定量下限分别为 100、10、5、3、3 µg/L。分析物和内标的结构式,以及推测的裂解途径示于图 8^[17]。

对于 LC-MS/MS 分析方法而言,稳定同位素内标是克服基质效应的首选方法。奥硝唑、M3、M6 分别有相应的氘代内标 d₅-奥硝唑、d₅-M3、d₅-M6;而 M16-1 和 M16-2 的氘代

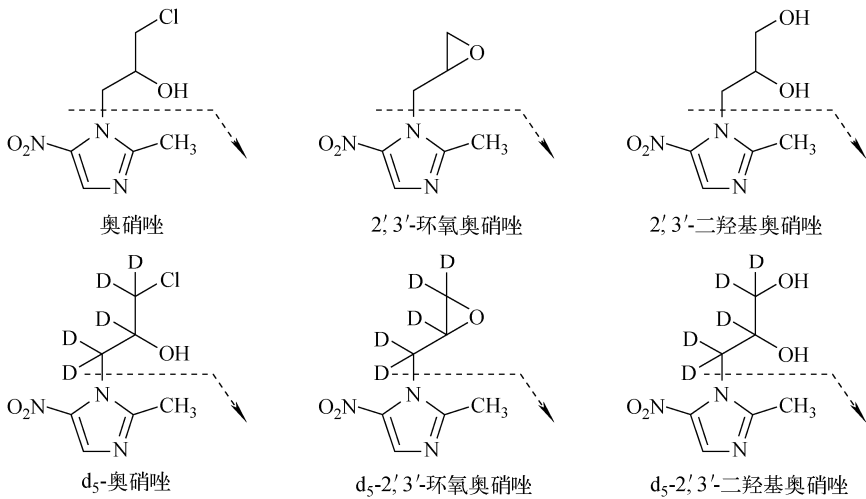
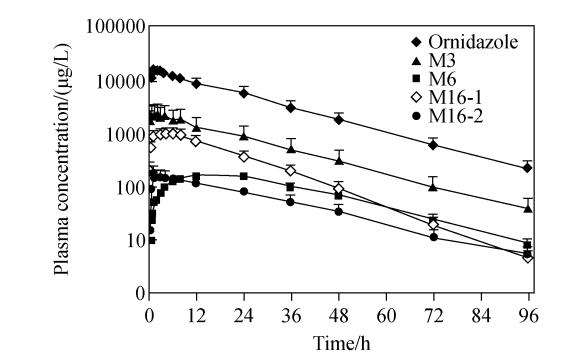


图 8 奥硝唑、2',3'-环氧奥硝唑、2',3'-二羟基奥硝唑及稳定同位素内标的结构和质谱裂解途径
Fig. 8 Structures and fragmentation pathways of ornidazole, 2',3'-epoxy ornidazole, 2',3'-dihydrodiol ornidazole and their stable deuterium-labeled ISs

内标难以制备,无法获得,但由于 d_5 -奥硝唑的线性较好,因此可将其用作 M16-1 和 M16-2 的内标。氘代内标中的氢原子被氘原子取代后,降低了其与色谱柱之间的相互作用,保留时间较未氘代分析物提前。实验中,奥硝唑、 d_5 -奥硝唑、M3、 d_5 -M3、M6、 d_5 -M6 的色谱保留时间分别为 3.73、3.65、2.61、2.56、1.64、1.61 min。因此,需仔细评估分析物及内标的基质效应。实验对 6 个不同来源的空白血浆进行考察,所有分析物和内标的基质效应均在 98.7%~104% 之间,不同来源的内标归一化基质因子的精密度小于 13.5%,说明所有分析物的基质效应可以忽略不计。

经验证后的 LC-MS/MS 分析方法成功地应用于 6 名中国健康志愿者单次口服 1 000 mg 奥硝唑的药代动力学研究,其药时曲线示于图 9^[18]。



注:误差线代表平均浓度值和标准差

图 9 6 名中国健康志愿者单次口服 1 000 mg 奥硝唑后,奥硝唑及其代谢物 M3、M6、M16-1 和 M16-2 的药时曲线图

Fig. 9 Typical plasma concentration-time profiles of ornidazole, M3, M6, M16-1 and M16-2 after oral administration of 1 000 mg ornidazole to six healthy Chinese volunteers

4 结论与展望

综上,目前克服基质效应的主要策略包括:使用稳定同位素内标、对强极性药物进行柱前衍生化、沉淀蛋白后稀释上清液。此外,针对不同药物的特点,通过液-液提取等手段进行生物样品预处理,用 APCI 取代 ESI 电离方式,推迟色谱出峰时间等,都是可以尝试的方法。随着质谱仪器灵敏度的提高,即使采用蛋白沉淀方

法处理样品,如果对生物样品进行大幅度稀释(如稀释 20 倍以上),也可能克服基质效应。近年来,出现了用于生物样品预处理的新型滤膜以除去血浆样品中的磷脂,从而避免基质效应。基质效应是 LC-MS/MS 分析方法中所特有的问题,因此克服或减少基质效应是十分重要的。在生物分析方法开发和应用中,有必要对基质效应进行仔细评估,确定其是否会影响分析物定量的重现性。

参考文献:

[1] JANUSCH F, KALTHOFF L, HAMSCHER G, et al. Evaluation and subsequent minimization of matrix effects caused by phospholipids in LC-MS analysis of biological samples[J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(17): 2 101-2 114.

[2] 王立琦,贺利民,曾振灵,等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展[J]. *质谱学报*, 2011, 32(6): 321-332.

WANG Liqi, HE Limin, ZENG Zhenling, et al. Progress in matrix effect of veterinary drug residues analysis by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2011, 32(6): 321-332(in Chinese).

[3] 冯晓杰,杜丽英,冯章英,等. LC-MS/MS 法测定人血药浓度的基质效应研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(13): 1 488-1 497.

FENG Xiaojie, DU Liying, FENG Zhangying, et al. Research progress of matrix effect in determining blood concentration by LC-MS/MS[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2015, 24(13): 1 488-1 497(in Chinese).

[4] 苏萌,艾连峰. 液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法[J]. *食品安全质量检测方法*, 2014, 5(2): 511-515.

SU Meng, AI Lianfeng. Matrix effects and elimination methods of liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2014, 5(2): 511-515(in Chinese).

[5] SALATTI-DORADO J A, CABALLERO-CASERO N, SICILIA M D, et al. The use of a restricted access volatile supramolecular solvent for the LC/MS-MS assay of bisphenol A in urine with a significant reduction of phospholipid-based matrix effects[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, (950): 71-79.

[6] TRUFELLI H, PALMA P, FAMIGLINI G,

- et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2011, 30(3): 491-509.
- [7] FUREY A, MORIARTY M, BANE V, et al. Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications[J]. Talanta, 2013, 115(115): 104-122.
- [8] ARRIVAUULT S, GUENTHER M, FRY S C, et al. Synthesis and use of stable-isotope-labeled internal standards for quantification of phosphorylated metabolites by LC-MS/MS[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(13): 6 896-6 904.
- [9] YANG Y, XU Q F, ZHOU L, et al. High-throughput salting-out-assisted liquid-liquid extraction for the simultaneous determination of atorvastatin, ortho-hydroxyatorvastatin, and para-hydroxyatorvastatin in human plasma using ultrafast liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(6): 1 026-1 034.
- [10] DENG P, JI C, DAI X J, et al. Simultaneous determination of capecitabine and its three nucleoside metabolites in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2015, (989): 71-79.
- [11] DIAO X X, MA Z Y, LEI P, et al. Enantioselective determination of 3-*n*-butylphthalide (NBP) in human plasma by liquid chromatography on a teicoplanin-based chiral column coupled with tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2013, (939): 67-72.
- [12] DIAO X X, MA Z Y, WANG H, et al. Simultaneous quantitation of 3-*n*-butylphthalide (NBP) and its four major metabolites in human plasma by LC-MS/MS using deuterated internal standards[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, (78/79): 19-26.
- [13] CHEN M X, LIU K, ZHONG D F, et al. Trimethylsilyldiazomethane derivatization coupled with solid-phase extraction for the determination of alendronate in human plasma by LC-MS/MS [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 402(2): 791-798.
- [14] YANG Y, LIU C, ZHANG Y F, et al. On-cartridge derivatization coupled with solid-phase extraction for the ultra-sensitive determination of minodronic acid in human plasma by LC-MS/MS method[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015, (114): 408-415.
- [15] ZHONG K, GAO Z W, LI Q, et al. A chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the stereospecific determination of morinidazole in human plasma [J]. Journal of Chromatography B, 2014, (961): 49-55.
- [16] DU J B, MA Z Y, ZHANG Y F, et al. Enantioselective determination of ornidazole in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry on a Chiral-AGP column[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 86(1): 182-188.
- [17] DU J B, MA Z Y, ZHANG Y F, et al. Simultaneous determination of ornidazole and its main metabolites in human plasma by LC-MS/MS; application to a pharmacokinetic study[J]. Bioanalysis, 2014, 6(18): 2 343-2 356.
- [18] LIU J, WANG L, HU W J, et al. Development of a UHPLC-MS/MS method for the determination of plasma histamine in various mammalian species[J]. Journal of Chromatography B, 2014, (971): 35-42.
- [19] LU Y M, SUN Z M, ZHANG Y F, et al. Simultaneous quantification of 22R and 22S epimers of budesonide in human plasma by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application in a stereoselective pharmacokinetic study[J]. Journal of Chromatography B, 2013, (921/922): 27-34.
- [20] YANG Y, YU J H, LU Y M, et al. High-sensitivity liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sodium picosulfate and its three major metabolites in human plasma[J]. Journal of Chromatography B, 2013, (915/916): 1-7.
- [21] WANG H D, DENG P, CHEN X Y, et al. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of febuxostat in human plasma[J]. Biomedical Chromatography, 2013, 27(1): 34-38.
- [22] LIU K, ZHONG D F, ZOU H Y, et al. Determination of tegafur, 5-fluorouracil, gimeracil and oxonic acid in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 52(4): 550-556.
- [23] ZHAN Y, CHEN X Y, ZHONG D F. Quantifying tetrapeptide SS-20 in rat plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass

- spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(30): 3 353-3 359.
- [24] DENG P, CHEN X Y, ZHONG D F. Quantification of polar drugs in human plasma with liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Bioanalysis*, 2009, 1(1): 187-203.
- [25] ZHANG Y, CHEN X Y, LI X Y, et al. Development of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method with precolumn derivatization for the determination of dencichine in rat plasma[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 566(2): 200-206.
- [26] PARK J S, PARK M Y, CHO Y J, et al. Anti-inflammatory effect of erdosteine in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells[J]. *Inflammation*, 2016, 39(4): 1 573-1 581.
- [27] 金经,陈笑艳,张逸凡,等. 柱前衍生化 LC-MS/MS 法同时测定人血浆中厄多司坦及其活性代谢物[J]. *药学报*, 2013, 48(3): 395-400.
- JIN Jing, CHEN Xiaoyan, ZHANG Yifan, et al. Simultaneous determination of erdosteine and its active metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pre-column derivatization[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2013, 48(3): 395-400(in Chinese).
- [28] CHIU M L, LAWI W, SNYDER S T, et al. Matrix effects—a challenge toward automation of molecular analysis[J]. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2010, 15(3): 233-242.
- [29] DING J F, CHEN X Y, DAI X J, et al. Simultaneous determination of apatinib and its four major metabolites in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study[J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, (895): 108-115.
- [30] YANG Y, LIU K, ZHONG D F, et al. Simultaneous determination of flumatinib and its two major metabolites in plasma of chronic myelogenous leukemia patients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, (895/896): 25-30.
- [31] WANG Y, CHEN X Y, SUN Z M, et al. Development and validation of a sensitive LC-MS/MS assay for simultaneous quantitation of ranolazine and its three metabolites in human plasma[J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, (889/890): 10-16.
- [32] 张娟,陈笑艳,戴晓健,等. 正负离子切换液相色谱-串联质谱法同时测定人血浆中头孢他啶和他唑巴坦[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(1): 20-25.
- ZHANG Juan, CHEN Xiaoyan, DAI Xiaojian, et al. Simultaneous determination of ceftazidime and tazobactam in human plasma with sequential positive and negative ionization liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection[J]. *Chinese Journal Pharmaceutical Analysis*, 2012, 32(1): 20-25(in Chinese).
- [33] 石荣伟,刘可,陈笑艳,等. 亲水作用色谱串联质谱法测定人血浆中的拉米夫定[J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(8): 1 448-1 452.
- SHI Rongwei, LIU Ke, CHEN Xiaoyan, et al. Determination of lamivudine in human plasma by hydrophilic interaction chromatography (HILIC) tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal Pharmaceutical Analysis*, 2011, 31(8): 1 448-1 452(in Chinese).
- [34] NEVILLE D, HOUGHTON R, GARRETT S. Efficacy of plasma phospholipid removal during sample preparation and subsequent retention under typical UHPLC conditions[J]. *Bioanalysis*, 2012, 4(7): 795-807.
- [35] ISOKAWA M, KANAMORI T, FUNATSU T, et al. Recent advances in hydrophilic interaction chromatography for quantitative analysis of endogenous and pharmaceutical compounds in plasma samples[J]. *Bioanalysis*, 2014, 6(18): 2 421-2 439.
- [36] SILVESTRO L, TARCOMNICU I, SAVU S R. Matrix effects in mass spectrometry combined with separation methods-comparison HPLC, GC and discussion on methods to control these effects [J]. *Tandem Mass Spectrometry-Molecular Characterization*, 2013: 3-37.
- [37] CRUZ-CORREA O F, LEÓN-CACHÓN R B R, BARRERA-SALDAÑA H A, et al. Prediction of atorvastatin plasmatic concentrations in healthy volunteers using integrated pharmacogenetics sequencing[J]. *Pharmacogenomics*, 2017, 18(2): 121-131.
- [38] SINGH P, MITTAL R, SHARMA G C, et al. Ornidazole: comprehensive profile[J]. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 2003, 30(3): 123-184.
- [39] DU J B, YOU T G, CHEN X Y, et al. Stereoselective glucuronidation of ornidazole in humans: predominant contribution of UDP-glucuronosyltransferases 1A9 and 2B7[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2013, 41(7): 1 306-1 318.