

药代研究中 MAS 法、蛋白沉淀法和固相萃取法等 前处理方法的比较

李建旺¹, 王 宛¹, 黄 韦¹, 冯俊雄¹, 汪群杰²

(1. 天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津 300457; 2. 中国农业科学研究院, 北京 100081)

Comparison of MAS Pretreatment, Protein Precipitation and Solid Phase Extraction in DMPK

LI Jian-wang¹, WANG Wan¹, HUANG Wei¹, FENG Jun-xiong¹, WANG Qun-jie²

(1. Tianjin Bonna-Agela Technologies, Tianjin 300457, China;

2. The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A new pretreatment method was introduced into DMPK(drug metabolism and pharmacokinetic) studies, which was named MAS(multi-function Impurity Adsorption SPE), utilizing some special adsorbents to remove the impurities, such as phospholipid. It has a better performance compared to traditional protein precipitation and SPE pretreatment. Combined with LC/MS, MAS can be applied in DMPK as a high throughput and effective pretreatment successfully.

Key words: DMPK; MAS pre-treatment; LC/MS

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0128-03

在药物代谢和动力学研究中, 需要对血浆中的药物进行检测, 但是基质中存在蛋白质、磷脂等杂质难以去除。传统的蛋白沉淀法虽然比较快速, 但是并不能有效地去除这些杂质; 而固相萃取方法由于操作步骤较多、效率低, 不适合 DMPK 大批量检测样品的需要, 而且存在一些水溶性很强的强极性药物, 固相萃取并不适合应用。

我们发展了一种快速高通量的方法, 称之为 MAS (Multi-function Impurity Adsorption SPE, 多重机制杂质吸附萃取净化法), 利用一些特殊的吸附材料配合乙腈的作用, 可有效地去除磷脂、脂肪和部分蛋白质, 最大程度上消除了杂质的影响。采用 96 孔板形式, MAS 法可以具备高通量地处理样品的能力, 满足 DMPK 的检测要求。本工作选择了一种叫氨氯地平的药物来验证 MAS 的实际应用效果。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪: 天津博纳艾杰尔科技有限公司产品, 配备紫外检测器, ABI4000 Q Trap 质谱检测器, 12 位固相萃取装置; Venusil ASB C₁₈ 液相色谱柱 (2.1 mm × 150 mm × 3 μm); MAS 净化柱; Waters HLB 固相萃取柱 (60 mg/3 mL)。甲醇、乙腈 (色谱纯),

甲酸、醋酸铵（分析纯），氨氯地平对照品（中国药品生物制品检定所）。

1.2 样品处理

1.2.1 MAS前处理法 用2 mL乙腈活化MAS净化柱。将200 μL 血浆和50 μL 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨氯地平标液涡旋混合均匀后，添加到MAS净化柱中。将2 mL 2%甲酸乙腈加入到MAS净化柱中（用移液枪快速将甲酸乙腈加入，利用冲击力使蛋白充分分散）。等待2 min后，开启真空泵将洗脱液抽过柱，收集洗脱液。最后用高纯氮气吹干洗脱液，用0.5 mL乙腈定容。经过0.22 μm 尼龙针式过滤器过滤，得到进样液。

1.2.2 蛋白沉淀法 将200 μL 样品和50 μL 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨氯地平标液加入5 mL离心试管，然后加入1 mL 1%甲酸乙腈，涡旋振荡3 min，10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min。取上清，用高纯氮气吹干，用0.5 mL乙腈定容。经过0.22 μm 尼龙针头式过滤器过滤，得到进样液。

1.2.3 固相萃取法 依次用2 mL甲醇和2 mL水活化HLB固相萃取柱。将200 μL 血浆和50 μL 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨氯地平标液涡旋混合均匀后，添加到HLB固相萃取柱中。以2 mL 5%甲醇水溶液淋洗HLB固相萃取柱。以2 mL甲醇洗脱HLB固相萃取柱，收集洗脱液。最后用高纯氮气吹干洗脱液，用0.5 mL乙腈定容。经过0.22 μm 尼龙针式过滤器过滤，得到进样液。

1.3 色谱条件

流动相：V（10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵缓冲盐）:V（乙腈）=40:60；流速 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ；柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 5 μL ；紫外检测器波长 260 nm；检测器：ABI4000 Q Trap；software version: Analyst 1.5。

2 结果与讨论

2.1 样品处理

MAS法不像蛋白沉淀法需要离心，操作比固相萃取法简单，因此效率高。

2.2 测量条件

选择ESI（+）离子化模式，分别用MRM： m/z 524/184（磷脂），MRM： m/z 409.1/238.1（氨氯地平）作为相应物质的特征监控离子。

表1 测试磷脂和氨氯地平的质谱参数设置

名称	DP	CE	CXP	EP	IS	TEM	GS1	GS2	CUR
磷脂	63 V	20 V	25 V	10 V	5 500 V	420 $^{\circ}\text{C}$	50 Pa	50 Pa	13 Pa
氨氯地平	50 V	14 V	9 V	10 V	5 500 V	430 $^{\circ}\text{C}$	60 Pa	60 Pa	12 Pa

注：DP：去簇电压；CE：碰撞电压；CXP：碰撞室出口电压；EP：碰撞室入口电压；IS：电喷雾电压；TEM：离子源温度；GS1：雾化气压力；GS2：辅助气流速；CUR：气帘气压力

3 小结

3.1 除蛋白质的效果

在260nm波长下监测蛋白，结果如图1显示：MAS法除蛋白的综合效果比其他两种方法更好。

3.2 除磷脂的效果

MAS法、蛋白沉淀法和固相萃取法处理完的样品的磷脂残留含量分别为165 000 cps，12 300 000 cps，7 670 000 cps。结论：MAS法去除磷脂的效果最好。

3.3 回收率

MAS法、蛋白沉淀法和固相萃取法处理的氨氯地平的回收率分别是89.2%，75.2%，56.1%。

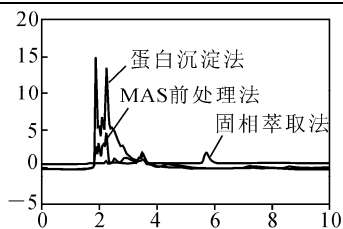


图1 蛋白质残留量比较

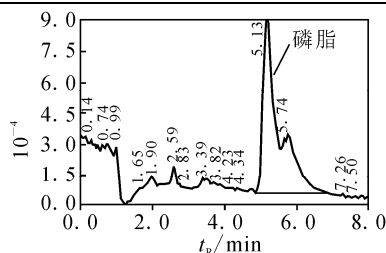


图2 磷脂特征离子色谱图

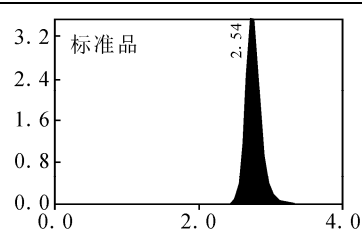


图3 氨氯地平的特征离子色谱图

MAS 前处理法相比较于蛋白沉淀和固相萃取法有更好的回收率和除蛋白质、磷脂等杂质的效果,且操作更为简单,效率高,适合在药物代谢研究方面的应用。

参考文献:

- [1] 郑 枫, 吴春勇, 邵琳智, 等. LC-ESI-MS/MS 测定人血浆中氨氯地平的含量[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(21): 1 663-1 666.
- [2] 陈赛贞, 徐珊珊, 陈 斌, 等. 健康志愿者口服氨氯地平片的药代动力学和生物等效性研究[J]. 中国药业, 2005, 14(9): 25-27.

(上接第125页)

2.5 实际应用

2008年12月, 彭水侯某死亡, 该死者因患有小儿麻痹, 长期服用曲马多镇痛。实验室运用该方法检验, 在血液中检出曲马多含量为 $312.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] 金有豫. 药理学[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 138.

(上接第127页)

3 小结

使用 MassWorks 软件对单位分辨质谱采集的质谱图校正, 实现了从几百种待选分子式中准确识别诺氟沙星、恩诺沙星、氧氟沙星分子式, 3 种目标药物的测量结果误差小于 10 mu, 极大地提高了单位分辨质谱在药物中未知物的定性能力。

参考文献:

- [1] MING G, WANG Y, ZHAO X, et al. Accurate mass filtering of ion chromatograms for metabolite identification using a unit mass resolution liquid chromatography/mass spectrometry system[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20: 764-770.
- [2] 刘 可, 马 彬, 王永东. 一种新软件方法用于单位分辨质谱仪上药物相对分子质量的准确测定[J]. 药学学报, 2007, 42(10): 1 112-1 114.