

使用ionKey/MS系统优化人血浆中缓激肽的SPE LC-MS/MS定量检测方法

Mary E. Lame, Erin E. Chambers, and Kenneth J. Fountain

Waters Corporation, Milford, MA, USA

应用优势

- 样品量减少2倍、灵敏度提升10倍，可以方便进行样品的多次进样，更好的满足ISR重复分析需求。
- 溶剂耗量减少50倍，节省分析成本。
- 采用混合模式SPE，可以减少基质干扰，增强在血浆中缓激肽萃取的选择性。
- Oasis μElution96孔板可浓缩样品，并在最大程度上减少肽损失，使血浆中缓激肽的检测限达到5 pg/mL。
- 选择性高的快速SPE提取（<30分钟）省去了耗时的免疫亲和纯化步骤。

沃特世解决方案

ionKey/MS®系统

ACQUITY UPLC® M-Class

IonKey™源

Xevo® TQ-S

iKey™ 分离装置

MassLynx™

Oasis® WCX 96孔μElution板

ACQUITY® 采集板

引言

对多肽类物质进行稳定、灵敏分析的需求是色谱分离和质谱测定的共同挑战。常见的肽通常难以通过LC-MS/MS进行分析，这是因为其不易离子化以及不易产生理想的碎片离子而导致MS灵敏度较低，从而使得LC和样品制备方法开发非常困难。之前的应用纪要 [\(720004833ZH\)](#) 详细说明了如何开发一种快速、灵活的SPE-LC-MS/MS分析方法，用于人血浆中缓激肽（图1）的定量；缓激肽是临床前或药物开发阶段重要的生物标志物¹。由于缓激肽在血浆中的浓度低至pg/mL水平且代谢速度快，在采血和样品制备过程中还可通过蛋白水解人为生成，因此对其进行准确定量相当困难。²

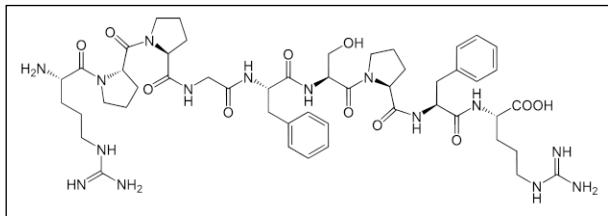


图1. 缓激肽典型结构和氨基酸序列。

在本实验中，使用ionKey/MS系统更新了整个LC-MS平台，新系统把UPLC®分析集成到质谱源中（图2）。如图3所示，iKey分离装置（150 μm内径）包含流路、电子元件、ESI接口、加热器、eCord和色谱填料以发挥UPLC分离性能。此外，与2.1 mm内径色谱法进行比较，这种技术可显著提高灵敏度，是肽分析的理想方法。大多数生物分析LC-MS/MS方法常常消耗大量的溶剂和样品，从而增加了分析的成本和限制了可重复分析次数。除灵敏度增加外，ionKey/MS减少溶剂和样品耗量，提供足够的样品进行重复进样，更好的满足ISR测试需求。

关键词

生物分析，Oasis，样品配制，肽定量，缓激肽，UPLC，二维技术，血浆，ionKey/MS，iKey

实验

方法条件

UPLC条件

系统: 二维ACQUITY UPLC® M-Class, 捕集器和反冲洗洗脱配置可选Xevo® TQ-S 质谱仪ionKey™ 源iKey™ 设备

色谱柱: BEH C₁₈, 300 Å, 1.7 µm, 150 µm × 50 mm iKey (p/n 186006764)

捕集色谱柱: Symmetry® C₁₈, 5 µm, 300 µm × 50 mm (p/n 186007498)

流动相A: 0.1%甲酸水

流动相B: 0.1%甲酸乙腈

上样溶剂: 99:1流动相A:B, 25 µL/min持续头2分钟, 阀切换

阀位置: 初始位置1(上样至捕集器), 在2分钟时改为位置2(反冲洗洗脱捕集器到分析色谱柱上)

分析梯度: 见表1

洗脱流速: 2.5 µL/min

色谱柱温度: 75 °C

样品温度: 15 °C

进样体积: 10 µL

总运行时间: 12.0分钟

采集板: 沃特世1 mL ACQUITY 采集板 (p/n 186002481)

方法条件

系统: Xevo TQ-S

离子化模式: ESI阳性

毛细管电压: 3.8 kV

源温度: 120 °C

锥孔反吹气流量: 50 L/hr

碰撞池压力: 3.83 × 10⁽⁻³⁾ mbar

碰撞能量: 按成分进行优化, 请参见表2

进样锥电压: 按成分进行优化, 请参见表2

数据管理

谱图软件: MassLynx® 4.1

定量软件: TargetLynx™

时间 (min)	流速 (mL/min)	组成 A (%)	组成 B (%)	曲线
0.00	2.5	98.0	2.0	初始
0.50	2.5	98.0	2.0	6
5.00	2.5	50.0	50.0	6
6.00	2.5	5.0	95.0	6
7.00	2.5	5.0	95.0	6
8.00	2.5	98.0	2.0	6

表1. UPLC梯度条件。

[应用纪要]

本研究利用专门设计的血液采集技术以抑制离体外缓激肽形成，利用混合模式固相萃取法(SPE)，使用新型高效ionKey/MS系统，实现缓激肽的高选择性、高灵敏度测定工作。相对于2.1mm直径色谱方法，ionKey/MS系统可获得更高灵敏度，这使得血浆使用量减少2倍，信噪比增加7-10倍(S:N)。因此，我们可以准确和精密地进行2.5 pg/mL缓激肽定量研究。

样品制备

血液采集

人血浆是从一例男性志愿者取得，血液收集在BD™ P100、P700、P800和血液采集管（仅含K₂EDTA）中。这几种BD P血液采集管含有各种专利稳定剂/抑制剂的混合物，能在血液采集过程中即时溶解，使得人血浆中的蛋白和肽类物质得以保存。

样品预处理

加入内标 (IS) [Lys-des-Arg9] - 缓激肽 (5 ng/mL) 10 μL至100 μL人血浆中，混匀。然后，样品用5% NH₄OH水溶液以1:1比例稀释，混匀。

样品萃取

按照图4的方案，进行血浆样品的预处理。所有溶液都按体积比配制。对含有样品的μElution板的所有孔都应用所有萃取步骤。



图2. ionKey/MS系统：由Xevo TQ-S、ACQUITY UPLC M-Class、ionKey源和iKey分离装置构成。



图3. iKey色谱分离装置。

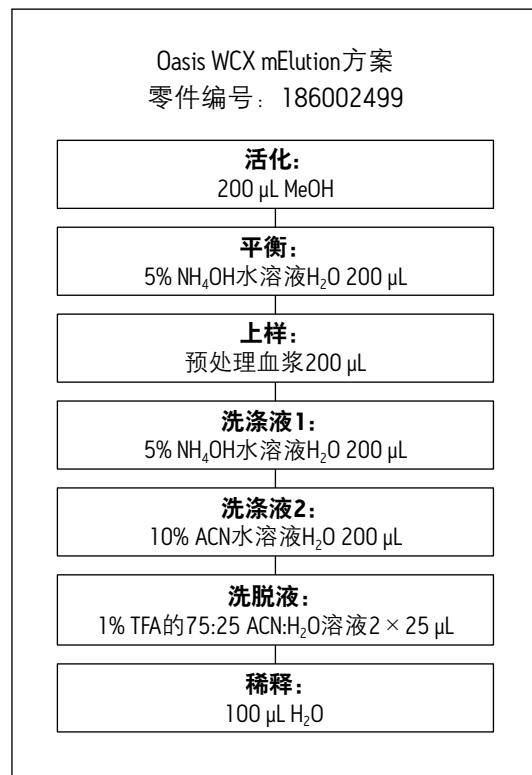


图4. Oasis μElution WCX萃取方案。

结果和讨论

质谱

缓激肽的3+前体 (m/z 354.18) 和IS (344.94) 用于定量。选择 m/z 419.18 y 3^{1+} 的碎片作为缓激肽定量分析的主要片段，而 m/z 408.18 b 4^{1+} 片段用于确证目的。关于IS，选择 m/z 386.03 b 7^{2+} 碎片进行监测。最优质谱条件列在表2中。虽然许多肽产生低于 m/z 200的大量丰度好的碎片，但这些离子（常常是铵离子）易产生较高背景干扰，因为它们缺乏特异性。在该分析中，使用高度特异性的b或y离子碎片（其 m/z 值高于它们的前体），获得显著改善的方法特异性，为LC和SPE方法建立提供了便利。

化合物	前体	MRM过渡	进样锥电压 (V)	碰撞能量 (eV)	子离子类型
缓激肽	[M+3H]3 ⁺	354.18 > 419.18	10	8	[1H ⁺] 1/y3
	[M+3H]3 ⁺	354.18 > 408.18	10	10	[1H ⁺] 1/b4
[Lys-des-arg9]-缓激肽 (IS)	[M+3H]3 ⁺	344.94 > 386.03	10	10	[2H ⁺] 1/b7

表2. 缓激肽和内标 (IS) [Lys-des-Arg9] 缓激肽的MRM通道、碰撞能量和进样锥电压。

色谱分离

缓激肽及其IS色谱分离，是通过微流控色谱分离装置 (iKey) 实现的。这种iKey具有UPLC级、亚-2- μ m颗粒填料，它可以在高压下操作，获得高效的LC分离。通过微流液相部件集成，可以避免毛细管连接有关的问题，包括人为因素、漏液和死体积。与分析规模 (2.1 mm 内径) LC-MS分析进行比较，使用BEH C₁₈, 300 Å, 1.7 μ m, 150 μ m × 50 mm iKey可获得极好的峰形、峰高增加、改善的S:N。采用BEH C₁₈, 300 Å, 1.7 μ m, 150 μ m × 50 mm iKey，缓激肽和IS的代表性色谱图列在图5中。运用多维色谱法（特别是捕集器和反冲洗策略），可获得进一步的清洁样品，方便装载高有机相SPE洗脱液10 μ L（维持肽类溶解度所要求的）而不发生分析物过载。此外，通常分析级色谱进样量（如10 μ L）应用到iKey上，可获得灵敏度的显著增加；有利于复杂基质中准确、可靠的检测较低pg/mL水平的肽和蛋白。

[应用纪要]

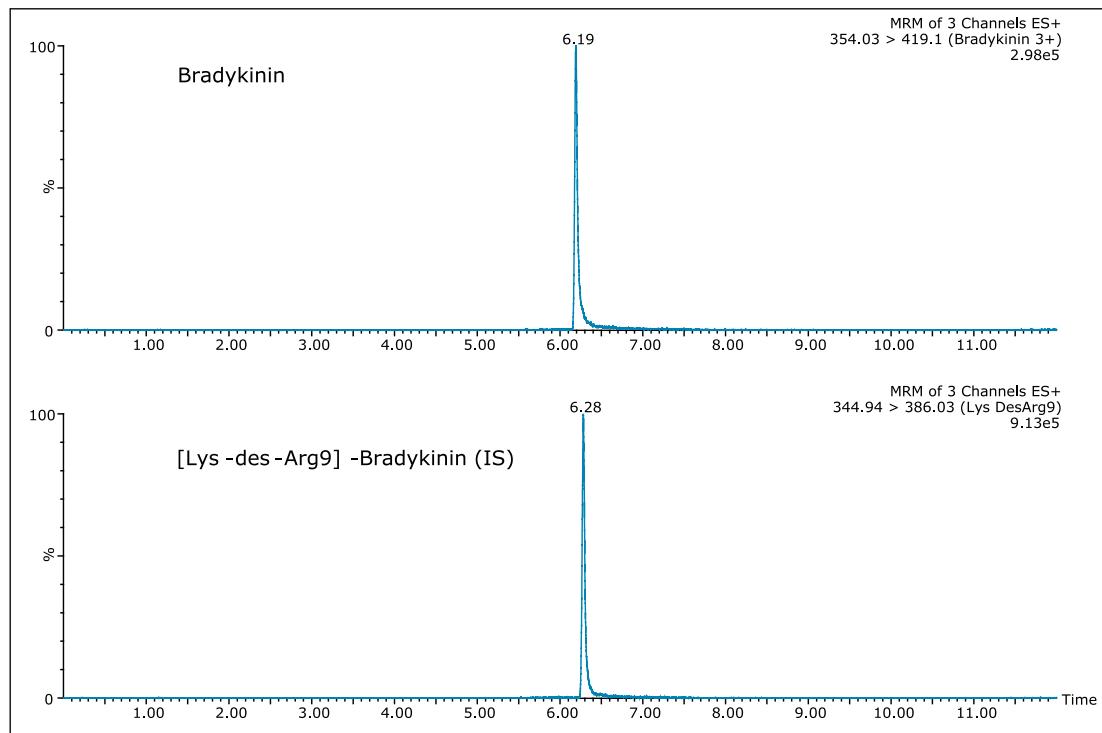


图5. 采用BEH C_{18} , 300 \AA , 1.7 μm , 150 $\mu\text{m} \times 50 \text{ mm}$ iKey, 缓激肽和内标从萃取血浆的UPLC分离。

使用ionKey/MS系统增加灵敏度

运用ionKey/MS可方便血浆中缓激肽的高效LC分离方法的开发，其灵敏度和S:N比采用2.1 mm内径色谱法显著提高。最初，样品是采用在前一份应用纪要 ([720004833ZH](#)) 中所述的方案萃取的。简言之，200 μL 的血浆萃取后，洗脱液用水以1:1比例稀释。取该样品3 μL 进样到iKey，与同一样品在2.1 mm级的10 μL 进样比较，可获得S:N的5倍改善，如图6所示。iKey离子化效率改善和灵敏度增加，使进样体积显著下降。采用ionKey/MS系统，可以以更小的进样体积 (1-3 μL) 获得相当或更高的灵敏度，当样品受限制或需要多次进样以符合ISR标准时，这种技术是理想的选择。

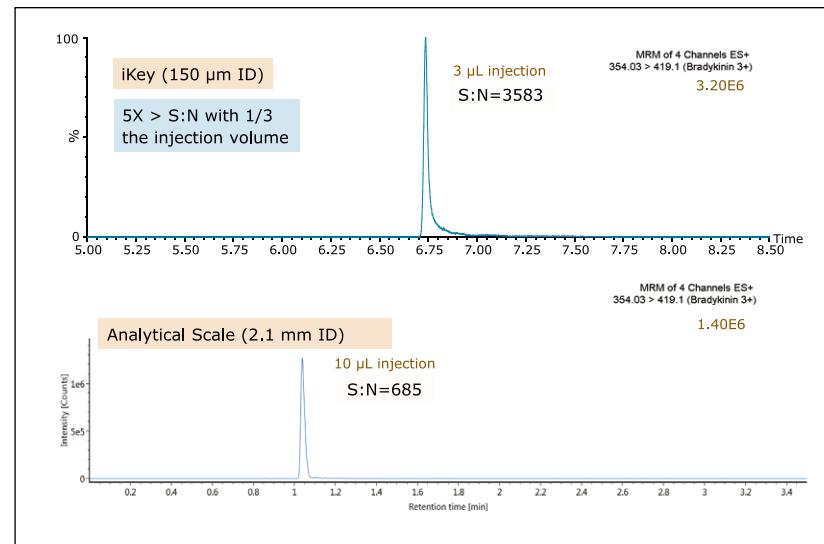


图6. 从人血浆 (200 μL) 萃取1 ng/mL过量加标缓激肽的比较：iKey (150 μm 内径) 对比传统分析流程 (2.1mm内径)。

[应用纪要]

经优化的方法使需要的血浆样品减少一半，且洗脱液稀释比增加至1:2，它们二者可以尽量减少基质干扰。采用ionKey/MS和传统分析系统（ACQUITY UPLC及Xevo TQ-S+UNIFI[®]），进行萃取血浆10 μ L进样（优化后方法）比较，采用ionKey/MS获得10倍信号增加和7倍S:N增加。这种改善如图7显示，附有缓激肽内源性水平比较。最终，使用150 μ m iKey建立缓激肽的低流速MRM测定方法，该方法只需要100 μ L血浆即可达到检测限度2.5 pg/mL。

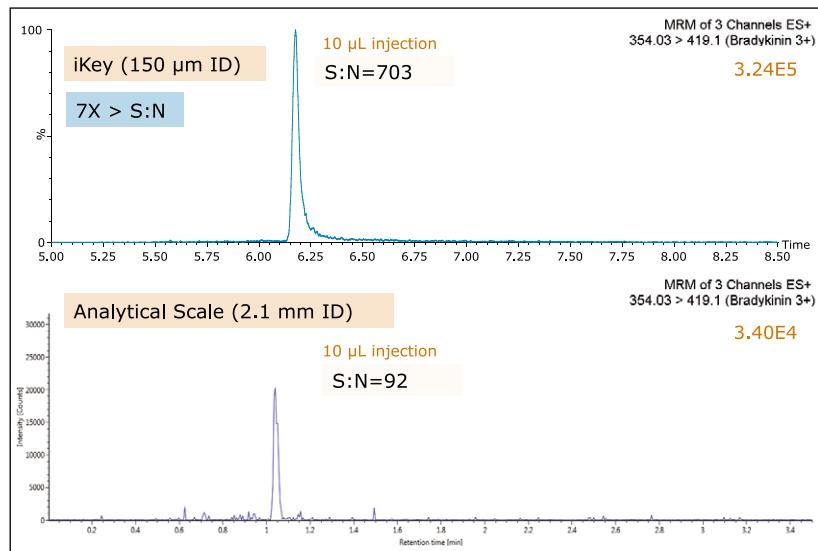


图7. 从人血浆 (100 μ L) 萃取的内源性水平缓激肽的比较: iKey (150 μ m内径) 对比传统分析流程 (2.1 mm内径)。

样品配制

将前一份应用纪要 ([720004833ZH](#)) 中详细说明的SPE方法应用于本研究。Oasis WCX SPE可提供反相和离子交换保留模式，帮助获得更好的样品纯度、选择性和提升灵敏度。此外，96孔Oasis μ Elution板可以在30分钟内进行人工处理，与大多数自动液相处理系统兼容，符合样品通量要求。这种格式也提供了非常小量（仅为50 μ L）洗脱的能力，可以尽量减少在蒸发过程中发生的（由于吸附在采集板上引起的）肽损失可能性和/或化学不稳定性。

[应用纪要]

线性、准确度和精密度

要产生标准曲线，人血浆（在BD P100管中获得）用缓激肽强化至以下最终浓度：2.5、5、10、20、40、60、100、600、1,000、2,000、4,000和8,000 pg/mL。每个标准水平都重复配制两份。质控（QC）样品从同一血浆配制，以15、30、50、150、300、800和6,000 pg/mL浓度配制。在每个水平的QC样品都重复三份配制。[Lys-des-Arg9]-缓激肽（最终浓度0.5 ng/mL）用作内标（IS）。通过分析物峰面积与IS峰面积的峰面积比值（PARs）及应用 $1/\text{浓度}/(1/x)$ 加权的线性回归模型建立标准曲线。然后，根据校准曲线，通过各自的PARs计算所有QC样品浓度。由于存在内源性缓激肽，故采用标准添加法。在对照血浆样品中，缓激肽的平均基础水平（0.19 ng/mL）是通过计算x-截距而测定的。然后，对所有标准曲线和QC样品，把计算的基础水平加到加标浓度上，使能够进行准确的定量。采用 $1/x$ 回归法，缓激肽呈线性，其 R^2 值>0.99。关于标准曲线性总结如表3中所示。QC分析获得的结果如表4所示。在所有水平，QC样品表现非常好的准确度和精密度，平均准确度介于92.7-104.0之间和平均%CV介于1.21-4.31之间。这些结果易于符合概述LC-MS/MS生物分析方法验证最佳规范^{3,4}的白皮书中概述的FDA验收标准

缓激肽过量 加标浓度 (ng/mL)	最终缓激 肽浓度 (ng/mL)	峰面积	IS面积	响应	计算的缓 激肽浓度 (pg/mL)	平均准确度
0.0025	0.1925	8595	20655	0.417	0.1891	98.2
0.0050	0.1950	8369	19474	0.430	0.1956	100.3
0.0100	0.2000	8493	19296	0.441	0.2008	100.4
0.0200	0.2100	8906	19386	0.460	0.2100	100.0
0.0400	0.2300	10287	19462	0.528	0.2432	105.8
0.0600	0.2500	10775	19588	0.551	0.2542	101.7
0.1000	0.2900	11441	19119	0.598	0.2771	95.5
0.3000	0.4900	20435	20694	0.988	0.4656	95.0
0.6000	0.7900	30256	18599	1.628	0.7753	98.2
1.0000	1.1900	54216	20792	2.608	1.2495	105.0
2.0000	2.1900	92974	19438	4.782	2.3018	105.1
4.0000	4.1900	181824	21490	8.454	4.0784	97.4
8.0000	8.1900	349881	20616	16.966	8.1969	0.1

表3. 从人血浆中萃取的缓激肽标准曲线汇总和统计。

缓激肽过量 加标浓度 (ng/mL)	缓激肽QC浓度 (ng/mL)	平均浓度 (ng/mL)	SD	%CV	平均准确度
0.0000	-	0.1860	0.003	1.62	-
0.0150	0.2050	0.2078	0.003	1.47	101.4
0.0300	0.2200	0.2268	0.003	1.26	103.1
0.0500	0.2400	0.2360	0.010	4.11	98.3
0.1500	0.3400	0.3152	0.014	4.31	92.7
0.3000	0.4900	0.4854	0.010	2.16	99.1
0.8000	0.9900	1.0293	0.031	3.06	104.0
6.0000	6.1900	6.0504	0.073	1.21	97.8

表4. 从人血浆萃取的QC统计学。

分析前处理和内源性缓激肽水平的评估

血浆中缓激肽的准确定量是特别困难的，因为它代谢迅速（其半衰期小于30秒），且在血液抽样和样品配制过程中可通过蛋白水解过程而人为产生^{2,5,6}。要评估缓激肽在血液中的最佳保存方法，以及预防缓激肽离体外形成，要特别注意血液采集的方案；这种方案采用市售血液采集管，其中含专利添加剂，这种添加剂可改善血浆分析物的回收率。更具体地说，BD P100、P700和P800采集管，提供了用于肽和蛋白分析的、血浆保存的一种方法⁷。所介绍的初始工作（[720004833ZH](#)）仅评估了缓激肽在P100血液采集管中缓激肽的保存。BD P100和P700血液采集管含有添加剂和抑制剂的专利混合物。BD P100采集管也含有机械分离器，这样在血液离心后可容易进行血浆采集和分离。P700管含有P100管的相同抑制剂，另外含有一种抑制剂，用于稳定胰高血糖样肽I（GLP-1），但不含机械分离器。和P100和P700血液采集管一样，P800血液采集管含有各种抑制剂的专利混合物（这些抑制剂可获得在血浆中生物活性肽的保存），但不含机械分离器。目前市售P800血液采集管拥有进行进行GLP-1、葡萄糖依赖性胰岛素释放肽（GIP）、胰高血糖素和脑肠肽的定量和测定。

[应用纪要]

萃取的内源性血浆缓激肽平均浓度列在表5中，其中血液是采用 (P100、P700) 和不含蛋白酶抑制剂 (仅含K₂EDTA，第1天和第4天) 的采集管分别采集的。内源性缓激肽水平的平均CV介于0.88%-2.18%范围，表明方法稳定可重现。关于这些结果的代表性谱图，列在图8 (方格A-D) 中。方格A是内源性血浆缓激肽的代表性谱图，其中血浆缓激肽得自在P100管中采集的血液，计算的平均浓度是0.1860 ng/mL。P700血液采集获得平均内源性缓激肽血浆水平0.0945 ng/mL，列在方格B中。该浓度约为采用P100管测定的浓度的一半。在没有抑制剂的血浆中，缓激肽的人工形成如在方格C和D中所示。在这些病例中，血液采集在仅含K₂EDTA的血液采集管中，所得血浆通过1个冷冻/解冻 (F/T) 周期获得。方格C代表在第1天的缓激肽浓度，而缓激肽血浆水平升高至0.8107 ng/mL。方格D代表于10 °C下、在4天贮藏后的缓激肽浓度，其中缓激肽血浆水平升高至5.4916 ng/mL。采用P800时，内源性缓激肽水平表现的相对峰面积计算，与P700采集的情况类似 (数据未显示)；但由于在P800管样品中IS的10X信号损失，对P800样品采集没有计算缓激肽的内源性水平。由于抑制剂混合物的差异，假定在P800管中，类似物IS未受到保护发生代谢和/或降解。此外，采用P700采集管时，内源性缓激肽血浆水平减少，表明抑制剂的这种混合物，对离体缓激肽形成的稳定和预防可能是更适当的。但是，尚未探索的另一种可能性是，血浆机械分离器的存在，提供了在血液采集和离心之前或其过程中缓激肽形成的一种机制。这些结果进一步强调需要适当的样品采集和贮藏，以准确地定量内源性缓激肽血浆水平。

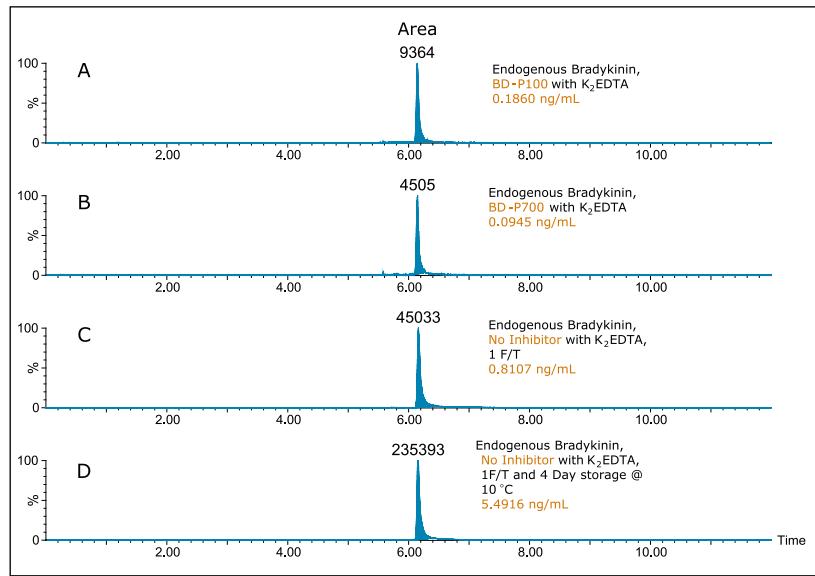


图7. 使用RADAR与MRM数据同步采集的尿液水解样品全扫描数据 (A)。3.79分钟的全扫描峰为N-去甲基米氮平，6.47分钟为去甲西酞普兰，7.42分钟为赛洛唑啉，这些化合物目前尚未包含在此目标性MRM方法中。

血浆处理	平均浓度 (ng/mL)	SD	%CV
BD-P100	0.1860	0.003	1.62
BD-P700	0.0945	0.002	2.18
BD-无抑制剂+ K ₂ EDTA, 1F/T	0.8107	0.007	0.88
BD-无抑制剂, K ₂ EDTA, 1F/T, 在10 °C下4天	5.4916	0.110	2.01

表5. 萃取的内源性血浆缓激肽平均浓度，其中血液是采用 (P100、P700) 及不含蛋白酶抑制剂 (仅含K₂EDTA，第1天和第4天) 采集的。

[应用纪要]

结论

采用ionKey/MS系统、混合模式SPE和更m/z b或y离子碎片，能获得更好的选择性和灵敏度，可以准确地定量缓激肽和鉴别浓度的细微差异。本实验使用100 μL血浆，可获得优于分析级别LC-MS（它采用两倍多的样品）得到的灵敏度和S:N。使用150 μm iKey，建立了高度灵敏、低流量的缓激肽MRM定量方法。该法可以在基础水平缓激肽基础上，区分2.5 pg/mL范围内的微小变化。在2.5-8,000 pg/mL范围，标准曲线是准确的和精密的。所有水平的QC样品，符合推荐的FDA推荐标准^{4,5}，平均准确度介于92.7-104.0范围和平均%CV介于1.2-4.31范围，表明该方法是准确的、精密的和可重现的。此外，与常规分析流速方法比较，这种肽以相同体积（10 μL）的样品进样，可获得>10X的灵敏度增加。ionKey/MS系统除获得优于2.1 mm直径规模的灵敏度以外，它也可以减少溶剂和样品耗量，从而减少成本，且可以进行样品的多次进样，获得改善的准确度或满足ISR重复分析要求。本研究也表明采用适当抑制剂（获得在血浆中缓激肽的稳定/保存）进行适当样品采集的重要性，以便准确地测定内源性水平。如果作进一步的验证，采用ionKey/MS系统为PK和临床研究中缓激肽准确测定奠定了基础。

参考文献

1. Lame ME, Chambers EE, Fountain KJ, Development of a Quantitative SPE LC-MS/MS Assay for Bradykinin in Human Plasma, <http://www.waters.com/waters/library, Library Number: APNT134773810, Part Number: 720004833ZH>
2. Murphey LJ, Hachey DL, Oates JA, Morrow JD, and Brown NJ, Metabolism of Bradykinin *In Vivo* in Humans: Identification of BK1-5 as a Stable Plasma Peptide Metabolite *J Pharmacol Exp Ther* July 1, 2000 294:263-269
3. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, Shah VP, Skelly JP, Swann PG, Weiner R, Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays, *Pharm. Res.*, 24 (2007) 1962-1973.
4. Bansal S, DeStefano A, Key elements of bioanalytical method validation for small molecules, *AAPS J.*, 9 (2007) E109-114.
5. Cugno M, Agostoni P, Brunner HR, Gardinali M, Agostoni A, Nussberger. Plasma bradykinin levels in human chronic congestive heart failure *J. Clin Sci (Lond)*. 2000 Nov; 99(5):461-6.
6. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellaconi A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet*. 1998 Jun 6; 351(9117):1693-7.
7. Molecular Diagnostics and Proteomics Blood Collection Systems, BD Diagnostics Corporation. http://www.bd.com/proteomics/pdfs/Molecular_Proteomics_Catalog.pdf

致谢

我们对下述人员表示感谢：

感谢Jeffrey Widdos和Biological Specialty公司对于本工作中人血浆的采集提供的帮助。

感谢David Craft和BD Diagnostics公司提供用于缓激肽血浆水平评估的血液采集管，且进行了关于各种BD血液采集管的技术探讨。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.[®]

Waters, The Science of What's Possible, UPLC, Oasis, ACQUITY UPLC, Xevo ACQUITY Symmetry, MassLynx和UNIFI是沃特世公司的注册商标。ionKey, iKey和TargetLynx是沃特世公司的商标。所有其它商标属于各自所有者。

©2014年沃特世公司。印制于中国。2014年2月 720004945ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010-5209 3866
上海：021-6156 2666
广州：020-2829 6555
成都：028-6554 5999
香港：852-2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com