

# 应用

## 采用Phree™除磷脂板和LC-MS/MS法测定人血浆中二甲双胍含量的快速方法

### 简介

二甲双胍是二型糖尿病一线治疗中广泛使用的一种非处方药,尤其是对于肥胖患者,并且在帮助预防与糖尿病相关的心血管疾病和癌症并发症方面也具有良好前景。二甲双胍主要通过抑制肝葡萄糖的产生来降低高血压。随着全球二型糖尿病确诊数量的不断增多,预计二甲双胍的使用量将继续增加。在其重要性不断提升的今天,对于二甲双胍口服产品的质量测试就显得尤为重要,并且以溶出度和相关生物等效性(BE)研究为代表的分析测试也需要寻求更加稳定高效的方法。

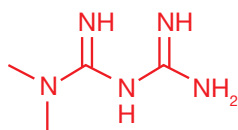
二甲双胍是一种高极性双胍分子,在血浆这样的复杂基质中可能会存在难以进行色谱分析的难题。与非专利药制药公司采取的常见生物等效性研究一样,我们将展示一种分析人血浆中二甲双胍含量的快速方法,包括样品制备和LC-MS/MS分析。我们将采用Phree除磷脂板,通过将蛋白沉淀和除磷脂相结合来制备样品。这种样品制备技术能非常有效地去除内源性的血浆蛋白和磷脂,这些物质会对分析柱的寿命以及检测中的离子抑制产生负面影响。我们将采用Phree除磷脂板来快速制备样品,以便更大限度地减少基质干扰物,并对该萃取方法的灵敏度、线性度、精密度、准确性和回收率进行评估。本研究将采用核-壳Kinetex® 5 μm C18 50 x 4.6 mm分析柱进行快速的LC-MS/MS分析(不超过2分钟),该方法可为现代分析实验室节省大量时间。

### 材料

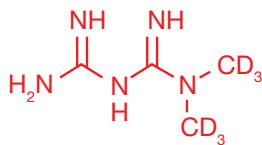
标准品以及其它助剂和化学品均来自Sigma Aldrich。

人血浆采购自BioIVT®(纽约韦斯特伯里)。

### 结构



二甲双胍



二甲双胍-d<sub>6</sub>

### 实验条件

通过制备人血浆中浓度分别为1、2、10、50、100、500、1000、2000 ng/mL的标准品来生成八个点构成的校准曲线(n=2)。制备8、800、1600 ng/mL三种浓度的QC样品(n=6)(分别称为QCL、QCM和QCH)。然后按照下文中的样品萃取流程,采用Phree除磷脂96孔板(Phenomenex货号:8E-S133-TGB)对上述标准品和QC样品进行萃取。

对于回收率测定实验,通过添加含有20 μL有效内标(IS)溶液的人血浆样品基质溶液来制备六份等效于QCM(800 ng/mL二甲双胍)的萃取前加标样品。然后按照样品萃取流程对上述样品进行处理。

在使用Phree萃取之后,样品氮吹之前,通过在含有20 μL有效内标(IS)溶液的人血浆空白样品中添加800 ng/mL二甲双胍的等效品来制备萃取后加标样品(回收样品,n=4)。

### 样品萃取流程

1. 将50 μL人血浆样品加入13 x 100 mm试管中,加入20 μL有效内标(IS)溶液(含500 ng/mL二甲双胍-d<sub>6</sub>的50:50乙腈水溶液)
2. 向样品试管中加入500 μL乙腈,混合至少30秒
3. 将样品放入Phree96孔板上的一个未使用的孔中,并施加正压或负压(5mm Hg)。
4. 使用2 mL的96深孔板(Phenomenex货号:AH0-7194)来收集洗脱后的样品
5. 在40°C的N<sub>2</sub>中干燥
6. 用400 μL的2 mM醋酸铵水溶液重新定容
7. 进样3 μL



## LC-MS条件:

分析柱: Kinetex<sup>®</sup> 5  $\mu$ m C18  
 规格: 50 x 4.6 mm  
 货号: 00B-4601-E0  
 样品制备: Phree<sup>™</sup>除磷脂96孔板  
 货号: 8E-S133-TGB  
 流动相: A = 2 mM醋酸铵水溶液 (pH值未调节)  
           B = 甲醇  
 等度: A/B (95:5)  
 流速: 750  $\mu$ L/min  
 进样量: 3  $\mu$ L  
 温度: 40  $^{\circ}$ C  
 检测: MS/MS (SCIEX<sup>®</sup> 4500 Triple Quad<sup>™</sup>) ESI 正离子模式  
 HPLC 系统: Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)  
 运行时间: 2 分钟  
 压力: 约 60 bar

## 结果与讨论

表1显示了SCIEX 4500 (ESI正离子模式) 使用的MRM Transitions 和数据采集的质谱参数设置。表2显示了迷你试验评估运行结果, 展示了该试验的准确性和精密度。试验中使用了三种浓度的QC (QCL、QCM 和 QCH), 各QC样品的准确性和精密度分别为94.7 – 99.8 %之间, CV% 在0.72 -7.16%之间。表3给出的使用Phree除磷脂96孔板得出的中等浓度QC样品 (QCM) 的样品萃取回收率结果为67.6%, CV% 为4.06% (n=6)。1 ng/mL 定量下限和 2000 ng/mL定量上限的代表性色谱图分别如图1和图2所示。本方法的线性动态范围通过分布于 1-2000 ng/mL 且线性度可接受 (r=0.9999) 的八个校准点测出, 重复测试两次, 校准曲线如图3所示。

表 1  
MRM Transitions

ID	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Dwell Time (msec)	DP	CE
二甲双胍1	130	60	100	45	18
二甲双胍2	130	71	100	45	16
二甲双胍-d <sub>3</sub> 1	136.1	60.1	100	80	18
二甲双胍-d <sub>3</sub> 2	136.1	77	100	80	16

表 2  
准确性和精密度

样品 ID	QCL	QCM	QCH
标称浓度 (ng/mL)	8.00	800	1600
1	8.50	778	1620
2	7.68	736	1590
3	7.40	781	1590
4	7.17	806	1580
5	7.76	827	1600
6	6.96	786	1600
Mean	7.58	786	1597
S.D.	0.54	30.6	11.5
% CV	7.16	3.89	0.72
% Theoretical	94.7	98.2	99.8
N	6	6	6

表 3  
萃取回收率

样品 ID	面积比 (二甲双胍/二甲双胍-d <sub>3</sub> )	平均	Std. Dev.	CV (%)	萃取回收率 (%)
QCM 1	1.48E+01				
QCM 2	1.40E+01				
QCM 3	1.49E+01				
QCM 4	1.54E+01				
QCM 5	1.58E+01				
QCM 6	1.50E+01	14.98	0.61	4.06	67.6
回收 1	2.20E+01				
回收 2	2.26E+01				
回收 3	2.33E+01				
回收 4	2.07E+01	22.15	1.10	4.98	

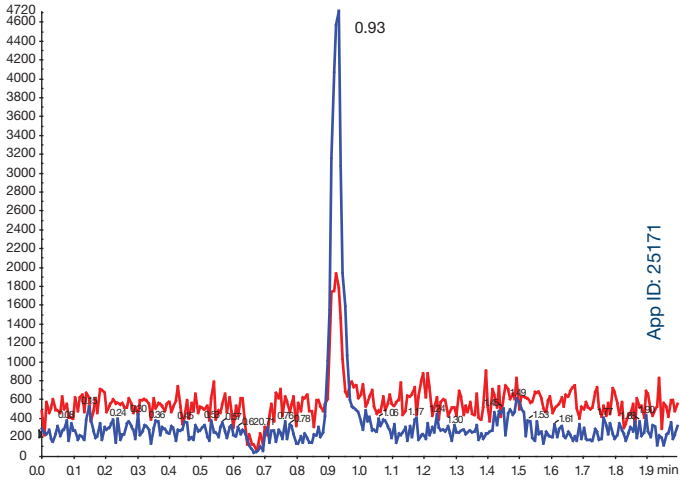
使用Phree 96孔板来进行蛋白沉淀和除磷脂, 可同时对多份样品进行处理, 从而减少样品制备花费的时间。为进一步缩短样品分析时间, 采用了短 (50 x4.6 mm) Kinetex C18分析柱来将二甲双胍分析物从样品制备阶段未完全去除的残留样品基质干扰物中分离出来。

## 结论

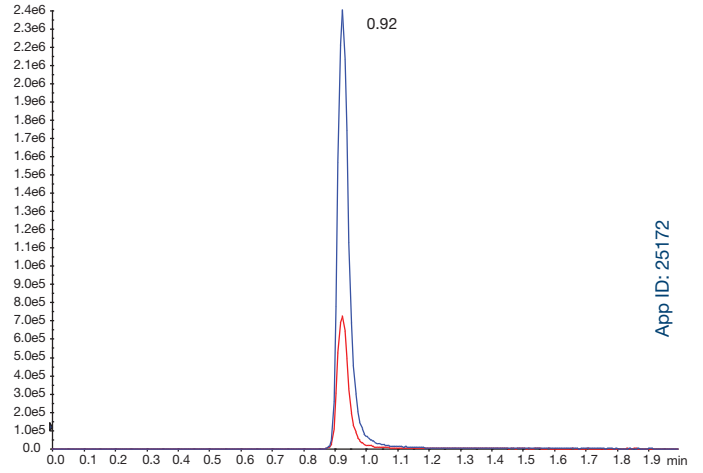
对于新型非专利药而言, 需要对多个患者样本的多个时间点进行分析, 以便展示其生物等效性。为确保实验的有效性, 采用高效的试验方法至关重要。在本技术说明中, 我们展示了一种采用Kinetex C18  $\mu$ m, 50 x4.6 mm分析柱的LC-MS/MS分析体系, 其总试验运行时间仅为2分钟。此外, 采用Phree 96孔板来进行样品制备也非常简单便利。Phree除磷脂板可提供非常清晰的萃取结果, 更大限度地减少内源性磷脂和血浆蛋白产生的基质干扰物峰。

此处展示的快速测定人血浆中二甲双胍含量的方法非常适合于生物等效性研究。此处展示的快速分析方法可降低研究和生产环境中高通量分析的成本, 且不会对分析效果产生任何不良影响。

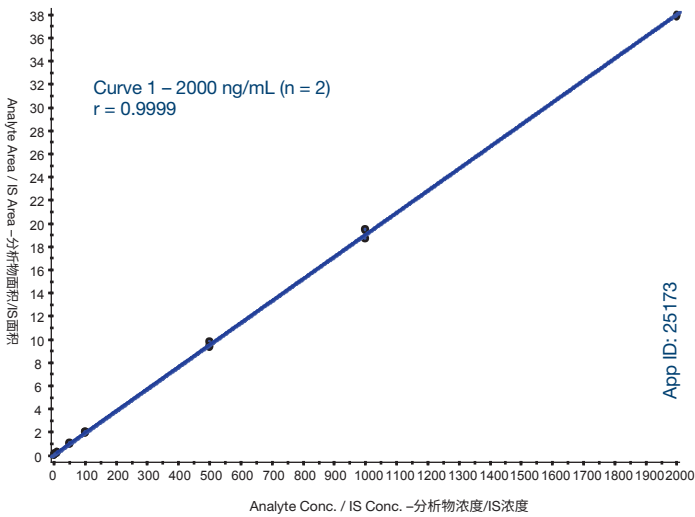
**图 1**  
人血浆中定量下限 (1 ng/mL) 色谱图



**图 2**  
人血浆中定量上限 (2000 ng/mL) 色谱图



**图 3**  
校准曲线



# 应用

## 订购信息

### Kinetex<sup>®</sup> 核-壳分析柱

5 μm 分析柱 (mm)					SecurityGuard ULTRA 柱芯 <sup>†</sup>
相	50 x 4.6	100 x 4.6	150 x 4.6	250 x 4.6	3/pk
C18	00B-4601-E0	00D-4601-E0	00F-4601-E0	00G-4601-E0	AJ0-8768
					适用于4.6 mm ID

### Phree<sup>™</sup> 除磷脂产品

货号	描述	单位
8B-S133-TAK	Phree除磷脂管, 1 mL 管	100/pk
8E-S133-TGB	Phree除磷脂96孔板	2/pk

<sup>†</sup>SecurityGuard<sup>™</sup> ULTRA 柱芯需要搭配柱套, 货号: AJ0-9000



#### 条款与条件

本档受 Phenomenex 标准条款与条件的约束, 具体详情请浏览 [www.phenomenex.com/TermsAndConditions](http://www.phenomenex.com/TermsAndConditions)。

#### 商标

Kinetex是Phenomenex的注册商标, Phree是Phenomenex的注册商标, Triple Quad是AB SCIEX Pte. Ltd的商标, SCIEX是AB SCIEX Pte. Ltd的注册商标。AB SCIEX目前在许可下使用。

#### 免责声明

对比分离不能代表所有应用。

仅用于研究目的。不可用于临床诊断程序。

© 2019 Phenomenex, Inc. 版权所有。


 ...breaking with tradition<sup>SM</sup>

[www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com)

Phenomenex 的产品在全世界范围内销售。欲查询您所在国家/地区的经销商, 请联系 Phenomenex 美国总部: [international@phenomenex.com](mailto:international@phenomenex.com)。