

应用

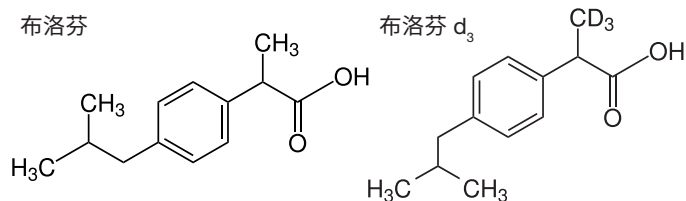
采用Strata[®]DE固相支撑液液萃取板和LC-MS/MS法测定人血浆中布洛芬含量的快速方法

Xianrong (Jenny) Wei, Sean Orlowicz和Philip J. Koerner Phenomenex 公司, 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501 USA

布洛芬是一种治疗类风湿性关节炎、炎性疾病和缓解轻到中度疼痛时常用的非处方药, 该药品是一种二芳基丙酸类的非甾体抗炎药 (NSAID), 具有多种口服剂量形式, 包括片剂、胶囊、嚼片和口服混悬液。与非专利药制药公司采取的常见生物等效性 (BE) 研究一样, 我们将展示一种分析人血浆中布洛芬含量的快速方法, 包括样品制备和LC-MS/MS分析。我们将采用 Strata DE 固相支撑液液萃取 (SLE) 96孔板来快速制备样品, 以便更大限度减少基质干扰物, 并对该萃取方法的灵敏度、线性度、精密性、准确性和回收率进行评估。本研究将采用Kinetex[®] 2.6 μ m C18 50 x 2.1 mm分析柱进行快速的LC-MS/MS分析, 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)。



实验条件

样品萃取

通过制备人血浆中浓度分别为10、20、50、100、250、500、800、1000 ng/mL 的标准品来生成八个点构成的校准曲线。制备50、400、800 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, 采用固相支撑液液萃取 (SLE) 96孔板 (Strata DE, 200 μ L, 96孔板, 货号: [8E-S325-FGB](#)) 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 100 μ L 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 (400 ng/mL 布洛芬) 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SLE萃取之后, 样品氮吹之前, 通过在含有 100 μ L有效内标 (IS) 溶液的人血浆空白样品中添加 400 ng/mL布洛芬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 μ L人血浆样品加入13 x 100 mm试管中
2. 加入100 μ L有效内标 (IS) 溶液 (含200 ng/mL布洛芬-d₃的0.1%甲酸水溶液)
3. 混合 (振荡) 样品30秒
4. 将样品加入Strata DE 96孔板上的一个未使用的孔中
5. 静置5分钟
6. 用600 μ L的95:5 二氯甲烷/异丙醇混合液洗脱样品, 并在2 mL的96深孔板 (货号 [AH0-7194](#)或[AH0-8635](#)) 中收集样品
7. 在40°C的N₂中干燥
8. 用200 μ L的70:30 0.1 %甲酸/乙腈混合液重新定容
9. 进样 10 μ L

LC-MS 条件

分析柱:	Kinetex 2.6 μ m C18 50 x 2.1 mm (货号: 00B-4462-AN)
样品制备:	Strata DE 200 μ L 96孔板 (货号: 8E-S325-FGB)
流动相:	A = 0.1 % 甲酸水溶液 B = 乙腈
LC条件:	等度: 40:60 (A/B)
流速:	500 μ L/min
运行时间:	2 分钟
温度:	40 °C
压力:	约150 bar
进样量:	10 μ L
HPLC 系统:	Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
质谱仪:	SCIEX [®] 4500 Triple Quad [™] , ESI negative (AB SCIEX Pte. Ltd.)



表 1
MRM Transitions

ID	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Dwell Time (msec)	DP	CE
布洛芬	205	161	100	-60	-10
布洛芬-d3	208	164	100	-80	-10

表 2
准确性和精密度

ID	QCL	QCM	QCH
标称浓度 (ng/mL)	50	400	800
1	50.4	405	828
2	48.3	379	762
3	49.8	348	769
4	47.3	398	746
5	49.5	384	793
6	43.7	381	744
Mean	48.2	383	774
S.D.	2.46	19.8	27.7
% CV	5.10	5.17	3.58
% Theoretical	96.3	95.6	96.7
N	6	6	6

表 3
萃取回收率

样品ID	面积比 (布洛芬/ 布洛芬-d ₃)	平均	STDV	CV (%)	萃取回收率 (%)
QCM 1	1.82E+00				
QCM 2	1.70E+00				
QCM 3	1.56E+00				
QCM 4	1.78E+00				
QCM 5	1.72E+00				
QCM 6	1.71E+00	1.72	0.09	5.19	77.3
回收 1	2.32E+00				
回收 2	2.37E+00				
回收 3	2.01E+00				
回收 4	2.17E+00	2.22	0.16	7.32	

图 1
人血浆中QCM (400 ng/mL) 色谱图

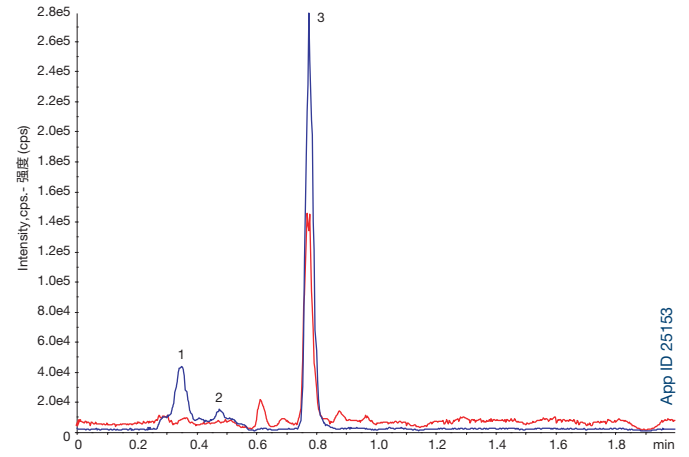
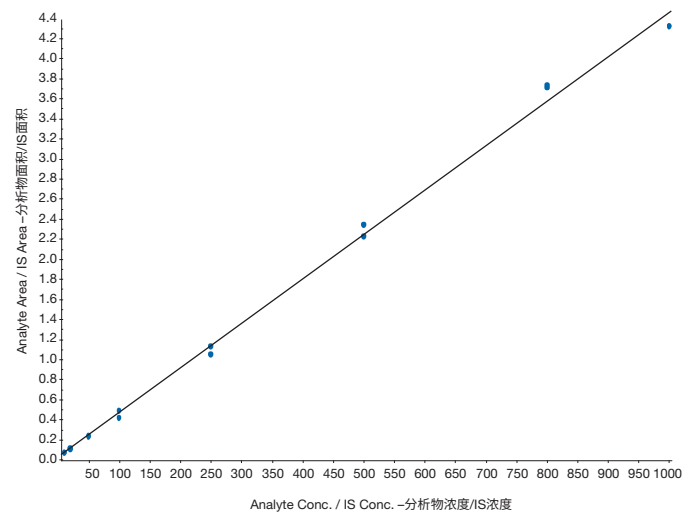


图 2
校准曲线范围



结果与讨论

表1显示了布洛芬和内标(布洛芬- d3)的 mass transitions 以及ESI负离子模式使用的质谱仪设置。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95.6 – 96.7 %之间, CV% 在3.58 -5.17 %之间。表3给出的使用Strata® DE SLE 96孔板得出的样品回收率结果为77.3 %, CV% 为5.19% (n=6)。浓度 400 ng/mL 的萃取 QCM 的代表性色谱图如图1所示,从图中可以看出,布洛芬与在人血浆基质中观察到的基质干扰物峰之间实现了良好的色谱分离。(请注意,如果想要或需要更洁净的样品,可采用其它样品制备技术,如固相萃取(SPE))。本方法的线性动态范围通过分布于10-1000ng/mL且具有可接受的线性度($r = 0.9999$)的八个校准点测出,重复测试两次,校准曲线如图2所示。

使用Strata DE 96孔板来进行SLE样品制备,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 x 2.1 mm) Kinetex C18分析柱来将布洛芬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。此类非常重要,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 2.6 μm , 50 x 2.1 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Strata DE固相支撑液液萃取96孔板来进行样品萃取也非常简单便利。此处展示的快速测定人血浆中布洛芬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不良影响。

订购信息

Kinetex®核-壳LC分析柱

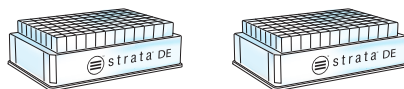
2.6 μm 分析柱 (mm)						SecurityGuard™ ULTRA 柱芯*
相	30 x 2.1	50 x 2.1	75 x 2.1	100 x 2.1	150 x 2.1	3/pk
C18	00A-4462-AN	00B-4462-AN	00C-4462-AN	00D-4462-AN	00F-4462-AN	AJ0-8782
						适用于 2.1 mm ID



*SecurityGuard™ ULTRA 柱芯需要搭配柱套, 货号: [AJ0-9000](#)

Strata®DE (硅藻土SLE) 96孔板

非常适合生物分析样品等小体积高通量净化。



Strata DE 96孔板	200 μL	400 μL
最大样品体积(稀释后)	200 μL	300 μL
建议洗脱体积	2x 600 μL	3x 600 μL
货号	8E-S325-FGB	8E-S325-5GB
单位	2/pk	2/pk



应用

澳大利亚 电话: +61 (0)2-9428-6444 auiinfo@phenomenex.com	墨西哥 电话: 01-800-844-5226 tecnicomx@phenomenex.com
奥地利 电话: +43 (0)1-319-1301 anfrage@phenomenex.com	荷兰 电话: +31 (0)30-2418700 nlinfo@phenomenex.com
比利时 电话: +32 (0)2 503 4015 (French) 电话: +32 (0)2 511 8666 (Dutch) beinfo@phenomenex.com	新西兰 电话: +64 (0)9-4780951 nzinfo@phenomenex.com
加拿大 电话: +1 (800) 543-3681 info@phenomenex.com	挪威 电话: +47 810 02 005 nordicinfo@phenomenex.com
中国 电话: +86 400-606-8099 cninfo@phenomenex.com	葡萄牙 电话: +351 221 450 488 ptinfo@phenomenex.com
丹麦 电话: +45 4824 8048 nordicinfo@phenomenex.com	新加坡 电话: +65 800-852-3944 sginfo@phenomenex.com
芬兰 电话: +358 (0)9 4789 0063 nordicinfo@phenomenex.com	西班牙 电话: +34 91-413-8613 espinfo@phenomenex.com
法国 电话: +33 (0)1 30 09 21 10 franceinfo@phenomenex.com	瑞典 电话: +46 (0)8 611 6950 nordicinfo@phenomenex.com
德国 电话: +49 (0)6021-58830-0 anfrage@phenomenex.com	瑞士 电话: +41 (0)61 692 20 20 swissinfo@phenomenex.com
印度 电话: +91 (0)40-3012 2400 indiainfo@phenomenex.com	英国 电话: +44 (0)1625-501367 ukinfo@phenomenex.com
爱尔兰 电话: +353 (0)1 247 5405 eireinfo@phenomenex.com	美国 电话: +1 (310) 212-0555 info@phenomenex.com
意大利 电话: +39 051 6327511 italiainfo@phenomenex.com	其它国家 美国总部  电话: +1 (310) 212-0555 info@phenomenex.com
卢森堡 电话: +31 (0)30-2418700 nlinfo@phenomenex.com	

条款与条件
本文档受 Phenomenex 标准条款与条件的约束,具体详情请浏览 www.phenomenex.com/TermsAndConditions。

商标
SecurityGuard是Phenomenex的商标。Kinetex和Strata是Phenomenex的注册商标。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。



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。