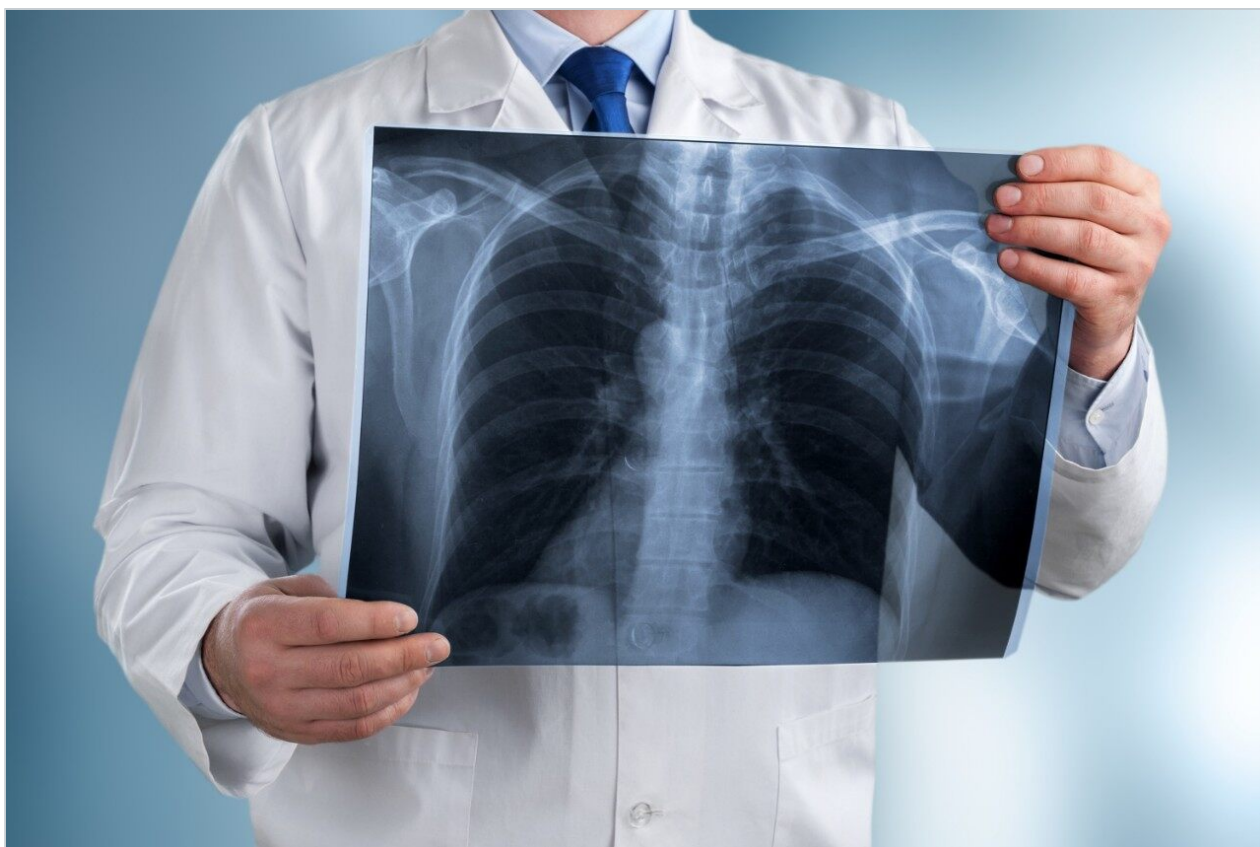


应用纪要

采用配备MaxPeak HPS技术的ACQUITY PREMIER系统和色谱柱进行吉非替尼（一种EGFR抑制剂）生物分析的优势

Nikunj Tanna, Robert S. Plumb

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

发现生物分析实验室日常负责针对新型分析物开发快速、灵敏且稳定的分析方法。虽然这些分子的理化特性可能已知，但它们在分析系统中的行为通常是未知的，可能对方法开发时间、数据质量、结果可信度和决策制定方面有不良影响。在这种情况下，分析人员期望所用的分析系统能够大幅减少分析物/表面相互作用，尽量减少样品损失并降低分析变异性。吉非替尼是一种小分子EGFR抑制剂，无已知的金属敏感性，因此被用作本研究的候选分子。采用MaxPeak高性能表面技术的ACQUITY PREMIER系统和ACQUITY PREMIER色谱柱有助于改善色谱峰形、灵敏度，并降低LLOQ水平下的分析变异性，从而实现更出色的低浓度检测、重现性和数据质量。

优势

- 改善峰形，提升结果质量
- 改善重现性，提高结果可信度
- 改善低浓度检测的灵敏度
- 减少分析物损失

简介

采用化学惰性表面屏障技术的分析系统对发现生物分析实验室的科学家而言具有非常重要的价值，这些科学家负责开发用于新型分析物（在分析系统内的相互作用可能尚未得到充分了解）的分析方法。

已有研究表明，采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY PREMIER系统和ACQUITY PREMIER色谱柱能够显著改善富含电子、对金属敏感的化合物（容易附着到金属表面）的色谱性能。此性能改善对于增强LC-MS方法的作用至关重要，有助于进一步了解疾病的生物学机制¹以及在发现²和开发过程中确定候选分子的代谢归宿³。由于这些杂化表面经过精心设计，可大幅减少金属螯合，此类分析物的性能改善也就不足为奇。

在本应用简报中，我们考察了这些新型杂化屏障表面技术对金属不敏感化合物的影响。选择吉非替尼(Iressa)作为本研究的候选分子。吉非替尼是一种表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂，适用于非小细胞肺癌(NSCLC)及某些乳腺癌患者。目前尚无有关吉非替尼具有金属敏感性的报道，但之前对该化合物报道的生物分析方法均在流动相中采用缓冲液以改善色谱峰形。本研究表明，使用ACQUITY PREMIER和MaxPeak HPS色谱柱能够改善吉非替尼生物分析的稳定性和重现性。

结果与讨论

将用甲醇溶解的吉非替尼(Iressa)添加至人血浆中，在0.75~1000 ng/mL浓度范围内绘制校准曲线。使用甲醇按1:3的比例对100 μ L各样品进行蛋白沉淀，重复三次。取250 μ L上清液转移至LCMS样品瓶中，并取10 μ L样品进样至LC-MS/MS系统中。在该分离中所用的LC-MS/MS方法与Tanna等人所述的方法相同²。简而言之，在HSS T3色谱柱上使用线性梯度进行分离，流动相A和B分别为包含0.1%甲酸的水溶液和乙腈溶液，流动相B在2.5 min内由5%增加至75%。对于吉非替尼，监测MRM通道448.22 \rightarrow 128.03以进行定量。在装配MaxPeak HPS色谱柱的ACQUITY PREMIER系统以及装配常规色谱柱硬件的常规UPLC系统中进样相同的样品组。

在两套系统上实现的LLOQ均为0.75 ng/mL，且由两套系统获得的校准曲线在0.75~1000 ng/mL范围内均呈线性。但是，如图1所示，对于LLOQ水平下的吉非替尼，采用ACQUITY PREMIER系统和MaxPeak HPS色谱柱获得了更优异的峰形和更高的峰面积。在常规系统和色谱柱上，尽管0.75 ng/mL下的LLOQ峰可定量，但观察到轻微的峰拖尾现象，可能增加积分变异性，从而导致%CV更高。这一现象如图2所示，其中比较了采用新型系统和色谱柱组合与常规系统和色谱柱分析较低浓度样品获得的%CV。对于校准曲线上的两个低浓度点，使用ACQUITY PREMIER系统和MaxPeak HPS色谱柱观察到的%CV均低于5%。而在标准系统/色谱柱组合上，LLOQ (0.75 ng/mL)和1 ng/mL水平下的%CV分别为17.5%和11.5%。此性能改善在较低的浓度下表现更为显著。由于低浓度水平下存在的分析物分子较少，因此这些分子在分析系统上因金属相互作用而引起的任何损失会更严重，从而导致低浓度下的结果变异性较高。ACQUITY PREMIER系统/色谱柱可大幅减少这些不必要的相互作用，即使在低浓度水平下也能获得更一致的峰面积和峰形，从而降低测量变异性，如图2中较低的%CV所示。虽然在常规系统/色谱柱上观察到的%CV值符合业界公认的生物分析方法验证指南要求，但较高的变异性可能引发问题，尤其是在处理临床后期样本时（其中基质变异高于安全性评估FTIH研究）。

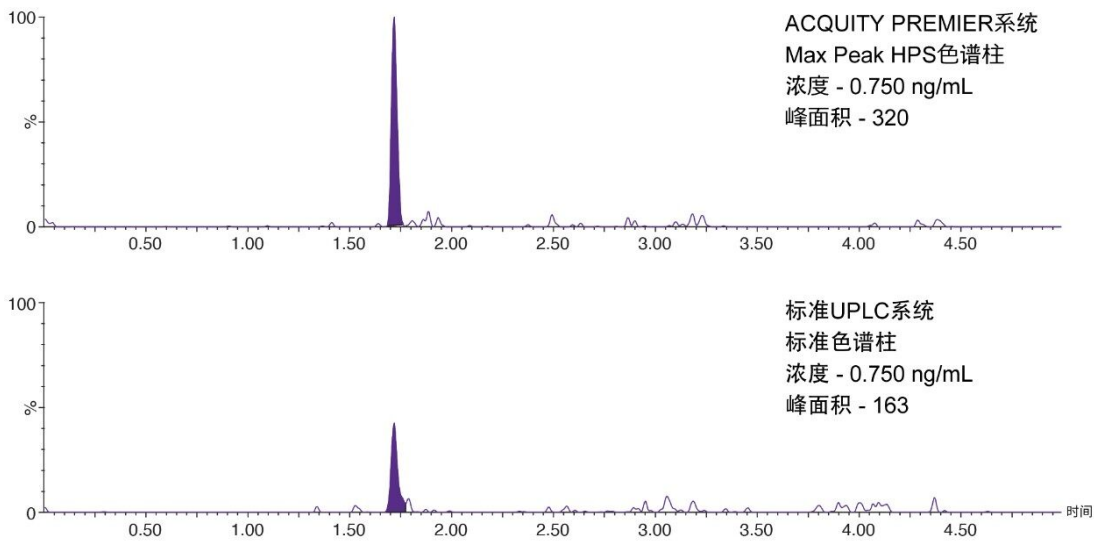


图1.吉非替尼 – 装配MaxPeak HPS色谱柱的ACQUITY PREMIER系统与装配标准色谱柱的标准ACQUITY液相色谱系统之间的LLOQ比较

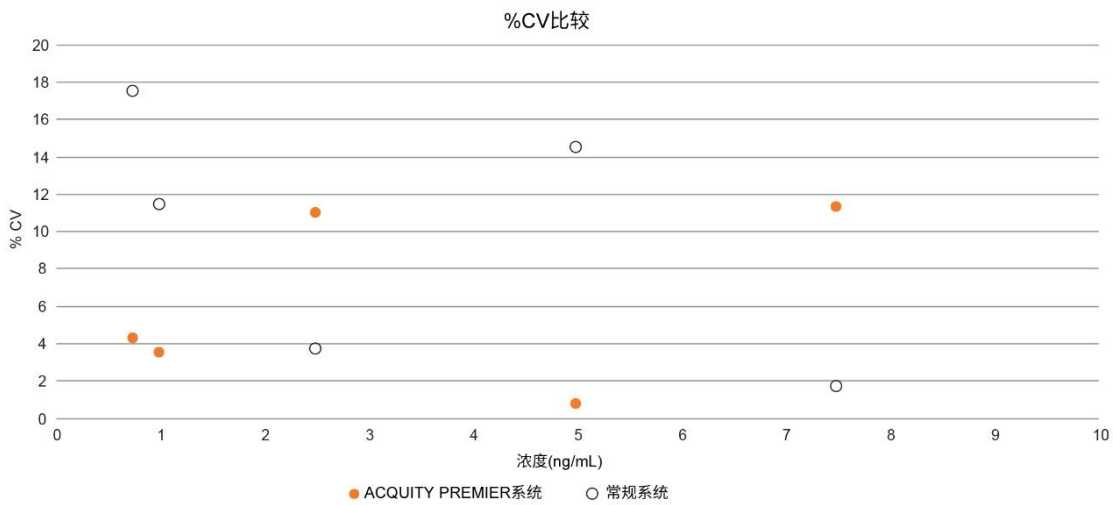


图2.装配MaxPeak HPS色谱柱的ACQUITY PREMIER系统与装配标准色谱柱的标准ACQUITY液相色谱系统之间的%CV比较

结论

对科学家而言，在尝试针对尚未充分表征色谱性能和金属敏感性的化合物开发快速、稳定的分析方法时，具有惰性的ACQUITY PREMIER系统和MaxPeak HPS色谱柱可能成为重要的工具。它在定量分析浓度水平极低的分析物时可能会改善积分的重现性，从而降低分析变异性（如本研究观察到的低浓度吉非替尼的%CV结果所示），提供更高的可信度。

参考资料

1. Kerri Smith和Paul Rainville.利用MaxPeak高性能表面提高三羧酸循环相关分析物的分离效果和回收率.沃特世应用纪要, 720006727ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/tca-cycle-analytes-by-mixed-mode-chromatography-mass-spectrometry.html>> , 2019.
2. Nikunj Tanna、Lauren Mullin和Rob Plumb.使用ACQUITY PREMIER和MaxPeak HPS色谱柱改善磷酸类固醇药物定量分析的灵敏度; 沃特世应用纪要, 720007095ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/improvements-in-sensitivity-for-quantification-of-steroid-phosphate-drugs-using-acquity-premier-lc-and-maxpeak-hps-columns.html>> , 2020.
3. Fadi L Alkhateeb, Ian Wilson, Margaret Maziarz, and Paul Rainville.Ultra High-Performance Liquid Chromatography Method Development for Separation of Formoterol, Budesonide, and Related Substances using an Analytical Quality by Design Approach.*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol 193, 2021.

特色产品

ACQUITY PREMIER系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007122ZH, 2021年1月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.