

应用纪要

利用Arc Premier系统和XSelect Premier色谱柱对磷酸类固醇（倍他米松、地塞米松和氢化可的松）进行灵敏的LC-MS定量分析

Mary Trudeau, Fadi L. Alkhateeb, Paul D. Rainville

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

在药物研究、发现和生产过程中，类固醇药物的LC-MS/MS定量需要采用灵敏且稳定的分析方法以实现准确定量。本研究重点介绍了Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3色谱柱分析金属敏感的磷酸类固醇分析物（地塞米松磷酸钠、倍他米松磷酸钠和磷酸氢化可的松三乙胺）时提高的色谱性能。

优势

- 使用Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3色谱柱可以改善磷酸类固醇的回收率和峰形，最终改善方法检测限和重现性
- 将Waters MaxPeak高性能表面(HPS)技术引入Arc Premier系统和MaxPeak Premier色谱柱，无需进行耗时的系统和色谱柱钝化，可大幅延长系统正常运行时间
- 快速、准确、稳定的类固醇定量分析，定量限1 ng/mL，分析时间仅需6.5 min

简介

磷酸类固醇的LC-MS分析方法开发存在诸多挑战，其中最具有代表性的是，这些化合物具有富电子性，因此非常容易吸附到液相色谱流路的金属表面。这种金属相互作用会对色谱性能产生不良影响，通常导致峰形不佳以及分析物回收率和重现性问题，最终限制分析方法的总体性能。通常使用高浓度分析物阻断吸附位点，对液相色谱系统和色谱柱进行活化或钝化。这种钝化方法虽然有效，但并不是长久之计。另一种常用方案是在流动相中使用螯合剂，例如EDTA。虽然这种方法也很有效，但使用螯合添加剂通常会对LC-MS分析产生不良影响，抑制质谱信号并降低灵敏度。

本文介绍的研究展示了Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3色谱柱对LC-MS分析定量性能的提升。采用MaxPeak HPS技术强化的色谱系统和色谱柱专门用于防止因离子相互作用引起的金属敏感分析物非特异性吸附，可显著改善峰形、回收率和分析方法的整体重现性，且无需进行系统或色谱柱钝化。

结果与讨论

使用标准ACQUITY Arc系统和标准不锈钢XSelect HSS T3色谱柱评估地塞米松、醋酸地塞米松、倍他米松磷酸钠、地塞米松磷酸钠和磷酸氢化可的松三乙胺的色谱性能，并与Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3

色谱柱进行比较。使用Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪进行质谱检测和定量。

在Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3色谱柱上，进样5 μL 类固醇（10 ng/mL，序列队列中的第3次进样）即可轻松检出所有分析物。如图1A所示。但是，同一天在标准ACQUITY Arc系统和标准不锈钢XSelect HSS T3色谱柱上使用样品组队列运行相同的样品时，非磷酸类固醇未检出，而地塞米松和醋酸地塞米松很容易检出，且峰响应与采用Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3色谱柱得到的结果相当。结果如图1B所示。

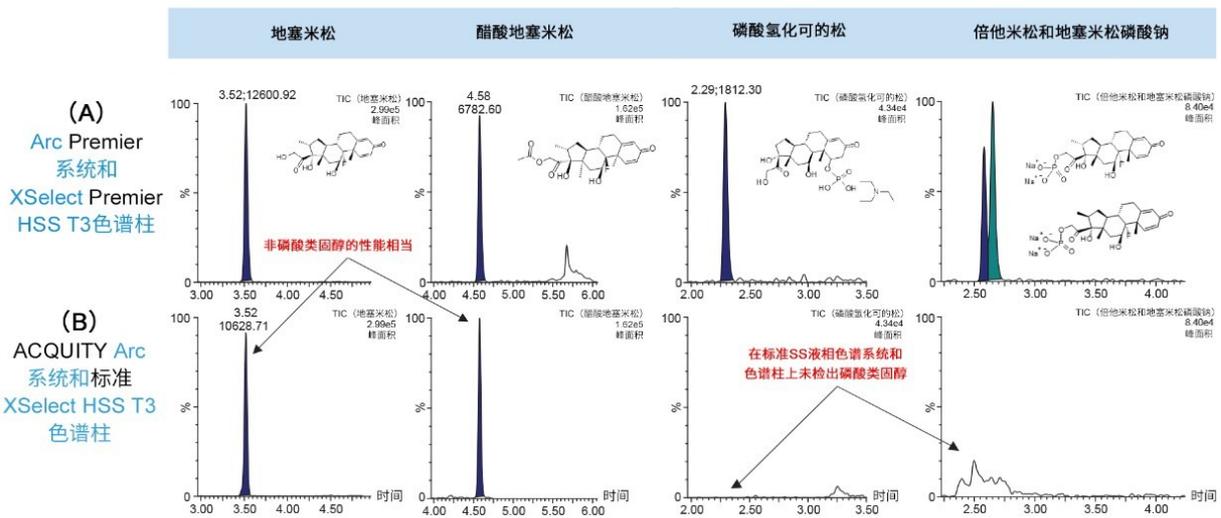


图1.使用Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3色谱柱(A)与标准ACQUITY Arc系统和标准XSelect HSS T3色谱柱(B)分析地塞米松、醋酸地塞米松、磷酸氢化可的松以及磷酸倍他米松和磷酸地塞米松得到的色谱性能图示。LC-MS系统：Arc Premier系统和标准ACQUITY Arc系统与Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪联用。色谱柱：XSelect Premier色谱柱或标准XSelect HSS T3色谱柱，2.5 μm ，2.1 \times 100 mm，35 $^{\circ}\text{C}$ 。进样体积：5 μL 。流动相A：0.1%甲酸的水溶液。流动相B：0.1%甲酸的乙腈溶液。流速：0.5 mL/min。梯度：初始为85%流动相A，然后在4.5 min内降至40%，再用5%流动相A冲洗0.5 min，在5.5 min时返回初始条件（总分析时间6.5 min）。

图2进一步展示了使用以下系统分析低ng/mL类固醇得到的磷酸倍他米松(4.37 min)和磷酸地塞米松(4.54 min)的开箱即用色谱性能：(A) Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3色谱柱；(B)标准ACQUITY Arc系统和标准XSelect HSS T3色谱柱。本次展示首先进样两个溶剂标准品空白样，然后将5 μL (10 ng/mL)类固醇混合物重复进样6次。类固醇第1次进样即获得优异的色谱性能：分析物回收率、峰形、分离度和可重现的MS响应。这些磷酸类固醇在标准ACQUITY Arc系统和SS色谱柱(2B)上的性能截然不同，类固醇分析物响应明显更低，并且随进样次数的增加而提高。此外，磷酸倍他米松和磷酸地塞米松的峰拖尾更明显，且分离结果不佳。

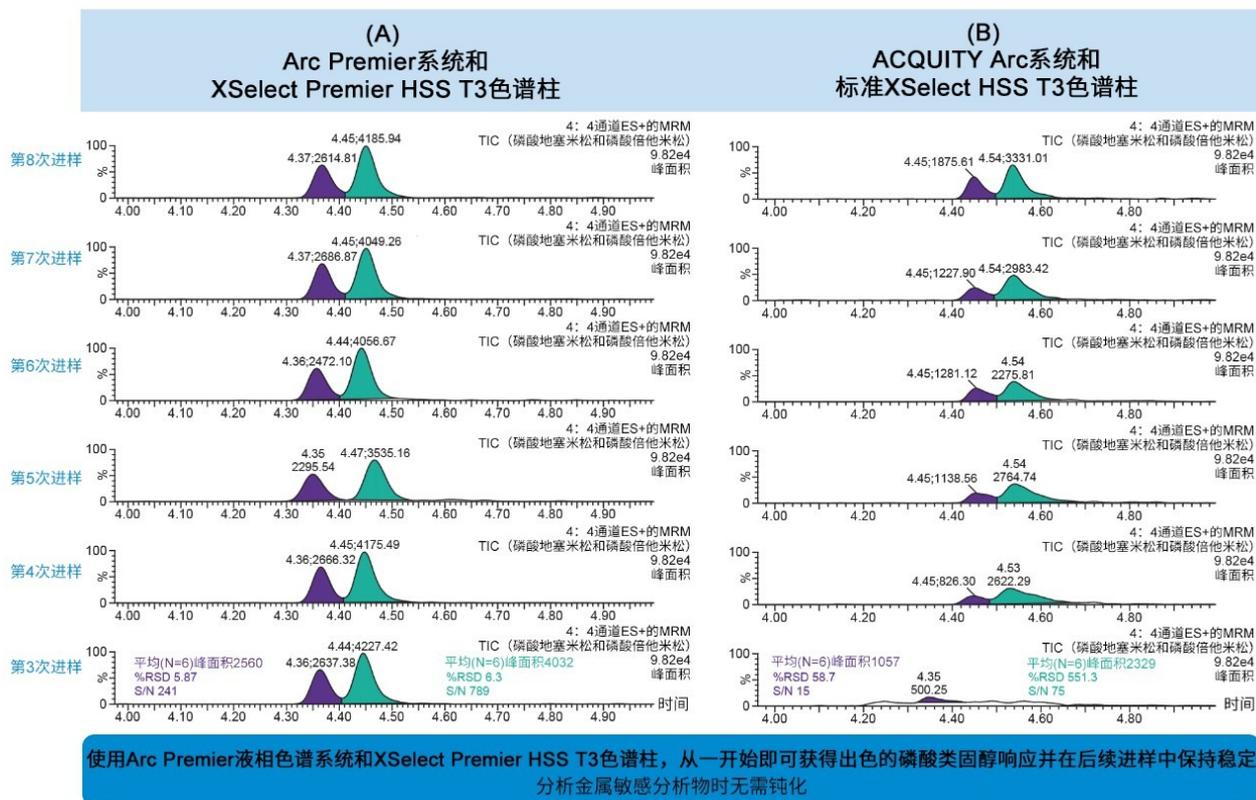


图2.使用以下系统分析磷酸倍他米松和磷酸地塞米松类固醇的开箱即用色谱性能：Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3色谱柱(2.5 μm , 2.1 \times 100 mm)，A图；同等标准ACQUITY Arc系统和标准不锈钢XSelect HSS T3色谱柱，B图。此分析使用了新色谱柱和洁净/冲洗后的液相色谱系统比较10 ng/mL磷酸氢化可的松溶液的六次重复进样（进样体积5 μL ）结果。采用Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3色谱柱时，第1次类固醇进样即观察到优异的色谱性能：分析物回收率、峰形、分离度和可重现的MS响应(A)；而采用标准ACQUITY Arc系统和标准XSelect HSS T3色谱柱时，磷酸氢化可的松发生明显损失，磷酸倍他米松和磷酸地塞米松的分离度不佳(B)，表明标准系统和色谱柱在每次后续进样时都发生钝化。

根据小分子分析方法开发指南^{1,2}，开发的分析方法必须能够证明线性（相关系数或 $R^2 \geq 0.98$ ）、准确度（ $\pm 15\%$ ）和精密度（ $\pm 15\%$ ）。将XSelect Premier HSS T3色谱柱(2.5 μm , 2.1 \times 100 mm)和Arc Premier系统与Xevo TQ-S micro联用，可轻松达到这些标准。所有五种类固醇的定量性能见表1。在1~250 ng/mL（地塞米松、醋酸地塞米松、磷酸地塞米松和磷酸倍他米松）和1~1000 ng/mL（磷酸氢化可的松）的动态范围内，使用 $1/x^2$ 加权得到的所有类固醇的线性(R^2)均高于0.99。评估的所有类固醇均可轻松达到1 ng/mL的定量下限(LLOQ)，所有类固醇的信噪比(S/N)范围为13~278。地塞米松磷酸钠、倍他米松磷酸钠和磷酸氢化可的松在LLOQ校准点的色谱性能如图3所示。

分析物	分子量 (g/mol)	MS (ESI+) MRM通道	LC 保留时间 (min)	LLOQ 基线峰宽(s)	LLOQ RMS S/N	峰不对称因子 (b/a)	校准曲线 动态范围 (ng/mL)	校准曲线权重	线性拟合 (r ²)	校准曲线 平均准确度 (%)
地塞米松	392.5	393.25 > 373.26	3.43	6.0	278	1.07	1-250	1/x2	0.995	100.0
醋酸地塞米松	434.5	435.4 > 397.32	4.43	6.6	59	1.10	1-250		0.998	100.0
地塞米松磷酸钠	516.4	473.31 > 435.21	2.7	4.8	66	1.27	1-250		0.993	98.2
倍他米松磷酸钠	516.4	473.31 > 435.21	2.62	5.4	35	1.06	1-250		0.998	97.2
磷酸氢化可的松三乙胺	543.6	443.3 > 327.23	2.33	6.0	13	1.32	1-1000		0.997	99.8

表1.类固醇定量性能，包括线性动态范围、平均校准曲线准确度、S/N和峰不对称性

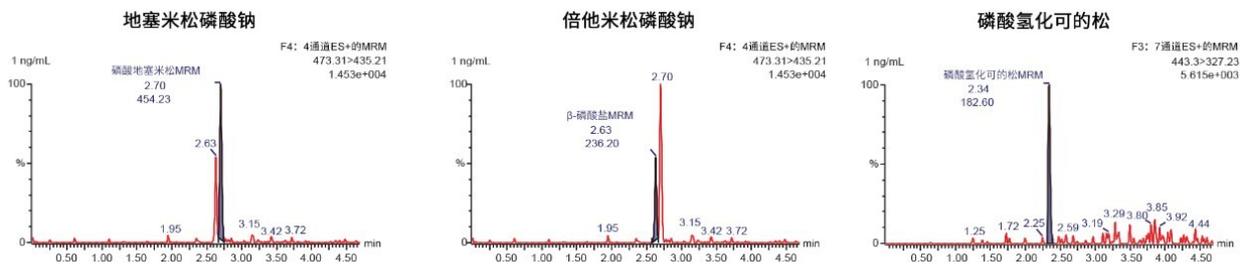


图3.高灵敏度类固醇定量结果：在地塞米松磷酸钠、倍他米松磷酸钠和磷酸氢化可的松分析中，使用开发的方法得到的LLOQ为1 ng/mL，该方法采用Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3色谱柱进行色谱分离，使用Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪进行检测。

结论

利用Arc Premier系统和XSelect Premier HSS T3色谱柱开发出一种用于类固醇药物的高灵敏度定量MRM方法，得到的LLOQ为1 ng/mL。采用MaxPeak HPS技术的Arc Premier系统和XSelect Premier色谱柱大大改善了磷酸类固醇、倍他米松、地塞米松和氢化可的松的回收率，同时非磷酸类固醇（地塞米松和醋酸地塞米松）的分析中表现出同等性能。此概念论证方法在准确定量类固醇以支持药物发现、研究和生产方面表现出巨大的潜力。

参考资料

1. Viswanathan, C. T.; Bansal, S.; Booth, B.; DeStefano, A. J.; Rose, M. J.; Sailstad, J.; Shah, V. P.;

Skelly, J. P.; Swann, P. G.; Weiner, R. Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays. Pharm. Res. 2007, 24, 1962–1973.

2. Bansal, S.; DeStefano, A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. AAPS J. 2007, 9, E109–114.

特色产品

Arc Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

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

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

XSelect Premier 2.5 μm 色谱柱 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135082004>>

720007269ZH, 2021年6月