

# 使用 Agilent Captiva EMR–Lipid 净化 对人血清中的药物进行 LC/MS/MS 定量分析

## 应用简报

临床研究

### 作者

Limian Zhao 和 Derick Lucas  
安捷伦科技公司

### 摘要

Agilent Captiva 增强型脂质去除产品 EMR-Lipid (Captiva EMR–Lipid) 是一款在 SPE 小柱或 96 孔板中使用的直通式净化产品。本研究展示了采用 Captiva EMR–Lipid 96 孔板对人血清中九种代表性药物化合物进行 LC/MS/MS 定量测定。样品的前处理方法为：采用原位蛋白质沉淀 (PPT) 去除蛋白质，然后采用 Captiva EMR–Lipid 净化去除油脂。整项研究是在 96 孔板上进行批处理。使用同位素或内标类似物对血清中所有九种药物化合物在 0.5–200 ng/mL 校准动态范围建立了定量分析方法。采用为期三天的准确度和精度运行来验证方法。结果显示此方法具有出色的校准曲线线性  $R^2 > 0.99$ ，QC 的所有五个水平都具有优异的准确性（定量下限 (LLOQ)  $< 20\%$ ，其他水平的  $< 15\%$ ）以及精度 (RSD  $< 15\%$ )。本文也对方法的选择性和交叉污染进行了评估。结果表明，采用原位 PPT 和 Captiva EMR–Lipid 净化包确立的方案显著改善了生物基质中药物化合物定量分析结果的可靠性。



Agilent Technologies

## 前言

定量测定生物基质中目标药物和代谢化合物的生物分析方法通常采用基于 96 孔板的高通量样品前处理方法。将样品直接等量加入 96 孔板，分析物萃取和基质净化的所有的样品前处理操作都在 96 孔板中进行。该流程具有较高的效率和生产力，广泛用于生物分析行业。生物定量分析的方法验证通常涉及严格、全面的要求，包括重复曲线的校准曲线线性、校准标样准确度、动态范围内强化质量控制 (QC) 样品的准确度和精度、方法的选择性、交叉污染和样品处理中分析物稳定性试验。严格的可接受标准为定量下限 (LLOQ) 为  $100\% \pm 20\%$  准确度、其他水平为  $100\% \pm 15\%$  准确度，LLOQ 为  $\leq 20\%$  RSD，其他水平为  $\leq 15\%$  RSD<sup>1</sup>。

基于 96 孔板的样品前处理技术通常包括固相萃取 (SPE)、液液萃取 (LLE)、固相支持液相萃取 (SLE) 以及蛋白质沉淀 (PPT)<sup>2</sup>。SPE 应用广泛，可用于生物体液中分子的 LC/MS/MS 定量分析，能够高效完成基质净化。但是，SPE 需要进行更多的方法开发研究，还需要采用多个步骤来进行捕集，然后再洗脱目标分析物<sup>3</sup>。相比 SPE，LLE 或 SLE 有时能够更高效地去除磷脂，但强极性分析物的回收率通常又是一大难题<sup>4</sup>。PPT 是生物体液样品前处理方法中最简单、最经济的一种，因此被广泛采用。有机溶剂如乙腈或甲醇用于解离生物体液样品，去除蛋白质。该方法并不会去除磷脂，因此会为定量分析方法和仪器维护带来很多问题<sup>5</sup>。

Agilent Captiva 增强型脂质去除 EMR-Lipid (Captiva EMR-Lipid) 产品系列是一种新型吸附材料，能够选择性去除样品基质中的主要脂类且不会造成分析物意外损失。脂质去除作用机制是利用体积排阻以及脂类的长脂肪链与 EMR-Lipid 吸附剂之间的疏水作用。选择性相互作用机制可以在 PPT 后有效地从生物体液中去除磷脂和其他种类的脂质。Captiva EMR-Lipid SPE 小柱/多孔板可以在直通净化后进行原位 PPT。其他应用简报对生物体液中磷脂去除效率进行了全面评估和对比<sup>6</sup>，证实了在 PPT 处理后，Captiva EMR-Lipid 具有出色的磷脂去除效率。在本项研究中，采用 Captiva EMR-Lipid 96 孔板方案对生物体液中的代表性小分子药物化合物进行了定量分析，并且获得了出色结果。所选的药物化合物在极性（亲水性和疏水性）和官能性（酸性、中性和碱性）方面差别很大。图 1 列出了目标分析物的化学性质和结构。根据标准生物分析方法验证指南对方法进行了验证。此外，研究三个样品批次的磷脂去除和分析物回收率，对 Captiva EMR-Lipid 吸附剂批次间重现性进行了评估。

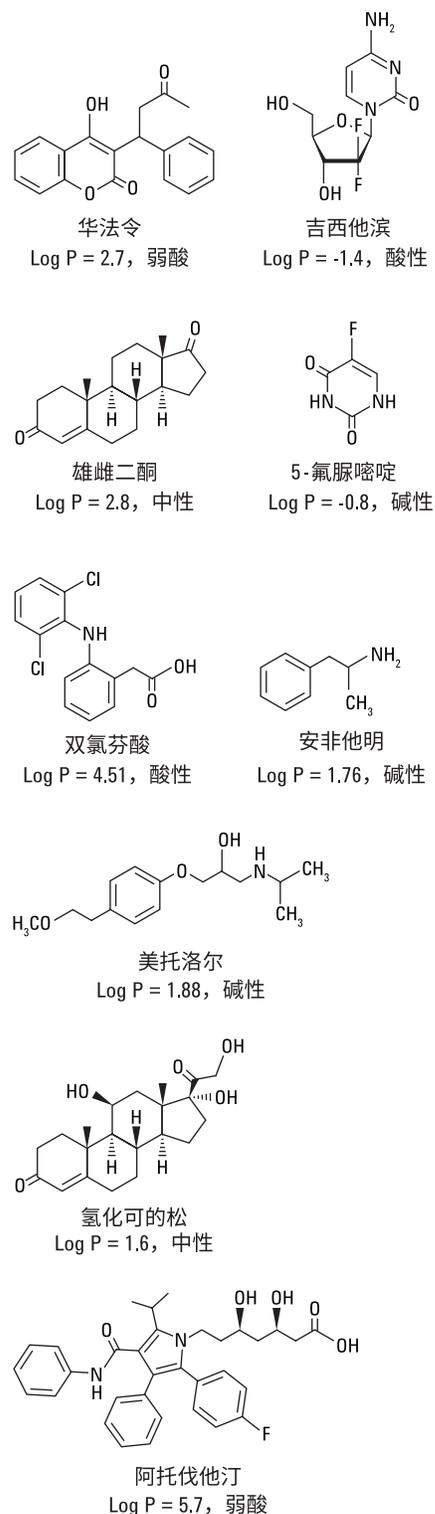


图 1. 代表性药物化合物的化学结构和属性

## 实验

### 试剂与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。乙腈 (ACN) 购自 Honeywell (Muskegon, MI, USA)。试剂级甲酸 (FA) 购自安捷伦公司 (部件号 G2453-85060)。化学标准品和其他化学品以纯粉末或标准储备液购自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。人血清购自 Biological Specialty Corporation (Colmar, PA, USA)。

### 标样和溶液

标样和内标 (IS) 储备液用甲醇或 DMSO 配制, 浓度为 2.0 mg/mL。混合标样加标溶液分别采用 1:1 乙腈/水配制, 浓度为 25 µg/mL。添加至等量样品的内标工作溶液采用 2:8 ACN/水配制, 浓度为 2 µg/mL。

向 20 mL 乙腈中加入 200 µL FA, 制成 1% FA 的乙腈溶液。该溶液用于蛋白质沉淀。

将 385.3 mg 醋酸铵溶解到 1 L Milli-Q 水中, 然后加入 1 mL FA, 从而制得 0.1% FA 的 5 mM 醋酸铵缓冲液 (作为流动相 A)。向 1 L 乙腈中加入 1 mL FA, 制成 0.1% FA 的乙腈溶液 (作为流动相 B)。

将 77.06 mg 醋酸铵溶于 200 mL Milli-Q 水中, 制得 5 mM 醋酸铵溶液。以 9:1 的比例混合缓冲液和乙腈, 制成复溶液。混合 80 mL 乙腈和 20 mL 水, 制成 80:20 乙腈/水溶液。

### HPLC 条件

参数	值
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 液相色谱柱, EC-C18, 150 × 2.1 mm, 2.7 µm (部件号 699775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 保护柱, EC-C18, 5 × 2.1 mm, 2.7 µm (部件号 821725-911)
流速	0.3 mL/min
柱温	30 °C
自动进样器温度	4 °C
进样量	8 µL
流动相	A) 5 mM 醋酸铵缓冲液, 含 0.1% 甲酸的水溶液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液
进样针清洗	1:1:1:1 ACN/MeOH/IPA/H <sub>2</sub> O, 含 0.2% FA, 冲洗时间: 7.5 s
梯度	时间 (min)    %B    流速 (mL/min) 0                6      0.3 2.5              40     0.3 7.0              90     0.3 7.01             100    0.3
停止时间	8 min
后运行时间	3 min

### MS 条件

参数	值
干燥气温度	120 °C
干燥气流速	14 L/min
雾化器压力	40 psi
鞘气温度	400 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	3000 V
iFunnel 参数	高压 RF: 150 V (正离子), 90 V (负离子) 低压 RF: 60 V (正离子), 60 V (负离子)
数据采集	dMRM

## 仪器与材料

### 用于样品前处理的仪器

- Centra CL3R 离心机 (Thermo IEC, MA, USA)
- Eppendorf 移液器和连续分液器
- ViaFlo 96 液体处理器 (Integra, Hudson, NH, USA)
- Captiva 真空夹 (部件号 A796)
- 真空泵 (Gast, Benton Harbor, MI, USA)
- CentriVap 浓缩仪, 冷阱和真空计 (Labconco, Kansas City, MO, USA)
- Agilent Captiva EMR—Lipid 96 孔板 (部件号 5190-1001)
- Agilent Captiva 96 孔板 1 mL 收集盘 (部件号 A696001000)
- Agilent Captiva 96 孔板盖, 10/包 (部件号 A8961007)

### 仪器条件

采用 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统进行分析, 该系统包括:

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)

该 UHPLC 系统与配备安捷伦喷射流 iFunnel 电喷雾离子源的 Agilent G6490 三重四极杆液质联用系统联用。采用 Agilent MassHunter 工作站软件进行数据采集和分析。

参见表 1 查看分析物 dMRM 参数, 图 2 为色谱图和峰鉴定结果。

表 1. 目标分析物的 LC/三重四极杆 dMRM 参数和保留时间

分析物	RT (min)	$\Delta$ RT (min)	极性	母离子 (m/z)	子离子			
					定量离子	CE (V)	定性离子	CE (V)
5-氟脲嘧啶	1.5	2	负离子	129	59.1	29	42.1	17
吉西他滨	1.7	2	正离子	264.1	112.2	17	95.1	49
安非他明	3.7	2	正离子	136.1	119.1	5	91	21
安非他明-D5 (IS)	3.7	2	正离子	141.1	124.1	5	93	13
美托洛尔	4.1	2	正离子	268.2	77	69	56.1	41
氢化可的松	4.7	2	正离子	363.2	121.1	25	91	73
雄雌二酮	6.1	2	正离子	287.2	109.1	29	97.1	25
华法令	6.1	2	正离子	309.1	251	15	163	8
阿托伐他汀	6.3	2	正离子	559.3	440.2	25	250.1	49
双氯芬酸	6.7	2	负离子	294	249.9	9	35.1	45
黄体酮-D9 (IS)	7.4	2	正离子	324.3	113.2	29	100	29

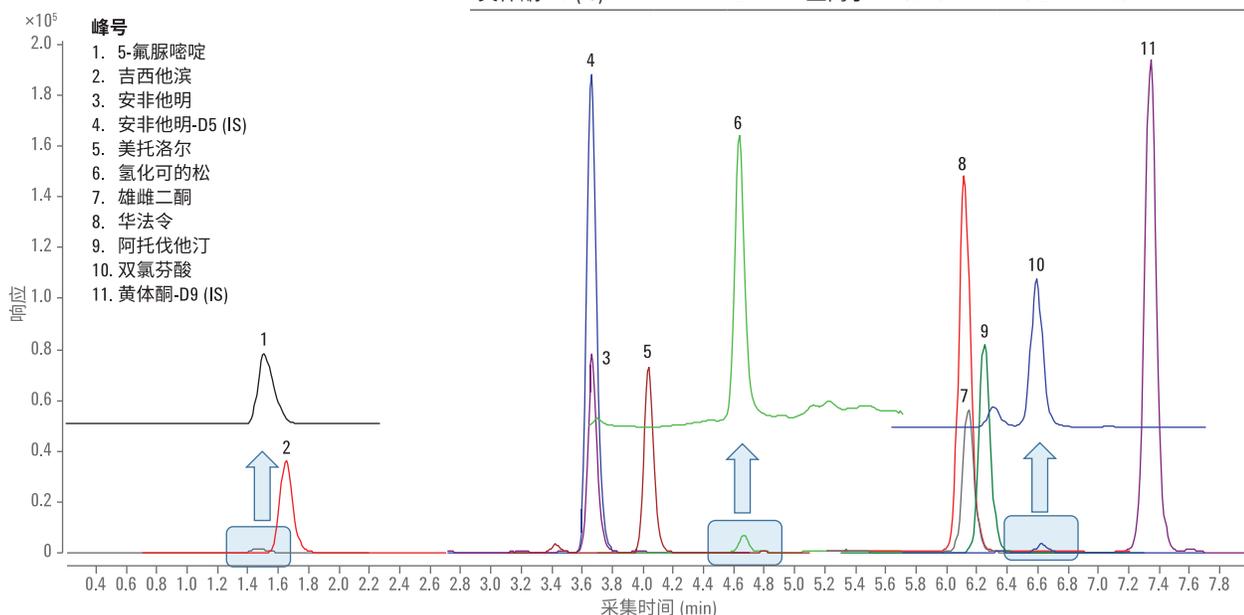


图 2. 添加了 50 ng/mL 药品标样和 200 ng/mL IS 标样的人血清样品的 LC/MS/MS 色谱图 (dMRM)。使用蛋白质沉淀, 然后采用 Agilent Captiva EMR—Lipid 净化对样品进行萃取。请参见样品前处理部分了解详细信息

## 校准标样和 QC 样品前处理

使用 25 µg/mL 1:1 乙腈/水的标样工作溶液在血清中制得标准校准曲线标样。为了减少溶剂加标对基质的影响，每次校准标样加标时新配置 250 ng/mL 的新鲜血清中间样品。校准曲线的动态范围为 0.5–200 ng/mL，包括 0.5、1、5、10、50、100、150 和 200 ng/mL。将合适体积的新鲜血清中间样品加入空白血清中，然后涡旋混合，从而制得这些标样。运行 5 个水平的 QC 样品，进行准确度和精度方法验证测试。这些水平包括 0.5 ng/mL (LLOQ)、2 ng/mL (低 QC)、50 ng/mL (中 QC)、150 ng/mL (高 QC) 和 200 ng/mL (定量上限 (HLOQ))。这些 QC 样品通过加入合适体积的血清中间样品制得。所有校准标样和 QC 都在 2 mL 卡口盖管中制得。然后将其等量加入 96 孔板中进行萃取。

### 样品萃取

表 2 详细描述了样品前处理流程。在 Captiva EMR—Lipid 孔板中向蛋白沉淀溶剂加入血清样品之前，先将血清样品等量加至收集盘，然后再加入内标溶液，这点非常重要。首先，这有助于同时传送多个样品至 EMR—Lipid 板中，可在孔板中同时进行 PPT，还能提高样品重现性。其次，重要的是将内标溶液添加至生物基质中，然后再进行混合，这样使得内标溶液达到平衡，在萃取之前能结合蛋白质，从而确保内标和目标分析物行为一致<sup>4</sup>。

表 2. 使用蛋白质沉淀，然后采用 Agilent Captiva EMR—Lipid 净化进行人血清样品前处理步骤

步骤	操作参数
将每个样品等分至 1 mL 96 孔板中。	100 µL
将 IS 工作溶液添加到除对照空白以外的每个样品中或者将 50:50 ACN/水添加至对照空白中。	10 µL
使用孔板盖盖好，然后以 2500 rpm 速度涡旋。	1 min
将含 1% FA 的 ACN 溶液加入位于另一个 1 mL 收集盘的 Agilent Captiva EMR—Lipid 板上。	300 µL
使用 96 液体处理器将整个样品混合物转移至 EMR—Lipid 板上。	110 µL
使用移液头将样品混合物在 EMR—Lipid 板上混合。	3-5 次
将 CapiVac 真空夹插入 EMR—Lipid 板和收集盘之间。	
向每个样品中添加补偿溶液 (80:20 ACN/水)	300 µL
施加适当的真空进行逐步稳定的洗脱。	2-4 英寸汞柱
最后，采用较高的真空对柱床进行排液。	8-10 英寸汞柱
移去收集盘，使用 CentriVap 蒸发干燥。	40 °C
使用 10:90 ACN/5 mM 醋酸铵缓冲液复溶。	100 µL
采用 2500 rpm 速度涡旋、超声，用盘垫盖住。	2 min + 5 min

### 方法验证

采用为期三天的准确度和精度 (A 和 P) 运行来验证方法。验证运行的序列包括：

- 双基质空白
- 基质空白 (用内标加标)
- 第一组校准标样
- 2-3 基质空白
- LLOQ (n = 6)
- 低 QC (n = 6)
- 中 QC (n = 6)
- 高 QC (n = 6)
- HLOQ (n = 6)
- 2-3 交叉污染基质空白
- 双基质空白
- 基质空白
- 第二组校准标样
- 2-3 基质空白

每个验证运行中总共有 56 到 58 个样品。

## 基质离子抑制效应研究

目标分析物的基质离子抑制效应影响采用标样柱后注射法<sup>7</sup>进行评估。利用注射泵通过与液相色谱柱与质谱检测器的流路结合的 T 型接头，将在 10:90 乙腈/5 mM 醋酸铵缓冲液中制得的 20 ng/mL 纯标样溶液柱后注入。图 3 显示了标样柱后注射设置的图。然后，采用上述分析方法，将在各种净化方法下制得的基质空白注入液相色谱系统中。扫描目标分析物 MRM 通道，获得完整八分钟色谱图窗口，监测基质对分析物响应的影响。

## 结果与讨论

这项研究展示了采用 Captiva EMR—Lipid 定量测定生物基质中的小分子。

## 方法验证

根据 LLOQ 和其他水平的准确度和精度可接受标准（例如，LLOQ 的准确度  $\geq 80\%$  并且  $\leq 20\%$  RSD；LLOQ 的准确度  $\geq 85\%$  并且  $\leq 15\%$  RSD），对为期三天的准确度和精度运行的定量分析结果进行分析。一共有 16 个校准点。任何超出准确度可接受水平的点都不能用于校准计算，但总的无法使用的校准点不能超过总校准点的 20%，否则运行失败。也就是说，16 个总校准点中的可用点必须  $\geq 13$ 。

表 3 显示了日内校准曲线标样结果。所有化合物具有可接受的校准曲线线性和准确度结果。经净化的基质可确保分析物响应的一致性，从而获得密集的线性重复校准曲线。相反，仅采用 PPT 处理的样品含有高丰度的磷脂<sup>6</sup>，使得运行期间分析物的响应不一致，导致获得发散和非线性的重复曲线（图 4）。这些发散曲线再加上无法使用的校准点超过 30%，表明运行失败。表 4 列出了日内 QC 准确度和精度结果，图 5 显示了日间分析结果。日内和日间准确度和精度结果都符合可接受标准。

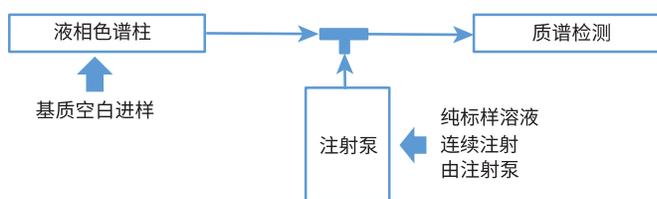


图 3. 用于基质离子抑制效应评估和对比研究的标样柱后注射设置图

表 3. 用时三日的准确度和精度运行校准曲线标样结果汇总

分析物	5-氟脲嘧啶	吉西他滨	安非他明	美托洛尔	氢化可的松	华法令	雌二醇	阿托伐他汀	双氯芬酸
校准曲线	回归	线性							
	重量	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x$	$1/x^2$	$1/x$
用于定量的 IS	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Pro-D9	Pro-D9	Pro-D9
第 1 天	使用的点 (总的点数)	14 (16)	15 (16)	16 (16)	16 (16)	15 (16)	15 (16)	16 (16)	15 (16)
	R <sup>2</sup>	0.9929	0.9912	0.9958	0.9907	0.9966	0.9914	0.9989	0.9965
	平均准确度	97.6	98.7	100.0	100.0	101.5	98.5	100.0	100.2
	RSD (n = 16)	8.5	7.3	3.8	5.2	5.8	8.2	2.5	3.9
第 2 天	使用的点 (总的点数)	14 (16)	15 (16)	15 (16)	14 (16)	15 (16)	15 (16)	16 (16)	15 (16)
	R <sup>2</sup>	0.9918	0.9964	0.9975	0.9961	0.9948	0.9912	0.9985	0.9958
	平均准确度	101.6	99.7	99.9	99.0	99.1	99.6	100.0	98.8
	RSD (n = 16)	5.8	2.7	2.3	6.3	6.1	6.8	3.7	6.0
第 3 天	使用的点 (总的点数)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	15 (16)
	R <sup>2</sup>	0.9926	0.9936	0.9953	0.9928	0.9910	0.9929	0.9993	0.9933
	平均准确度	100.5	99.2	99.7	99.5	99.4	98.9	100.0	100.0
	RSD (n = 16)	5.0	5.1	4.9	6.7	4.8	2.6	2.2	6.1

Am = 安非他明；Pro = 黄体酮

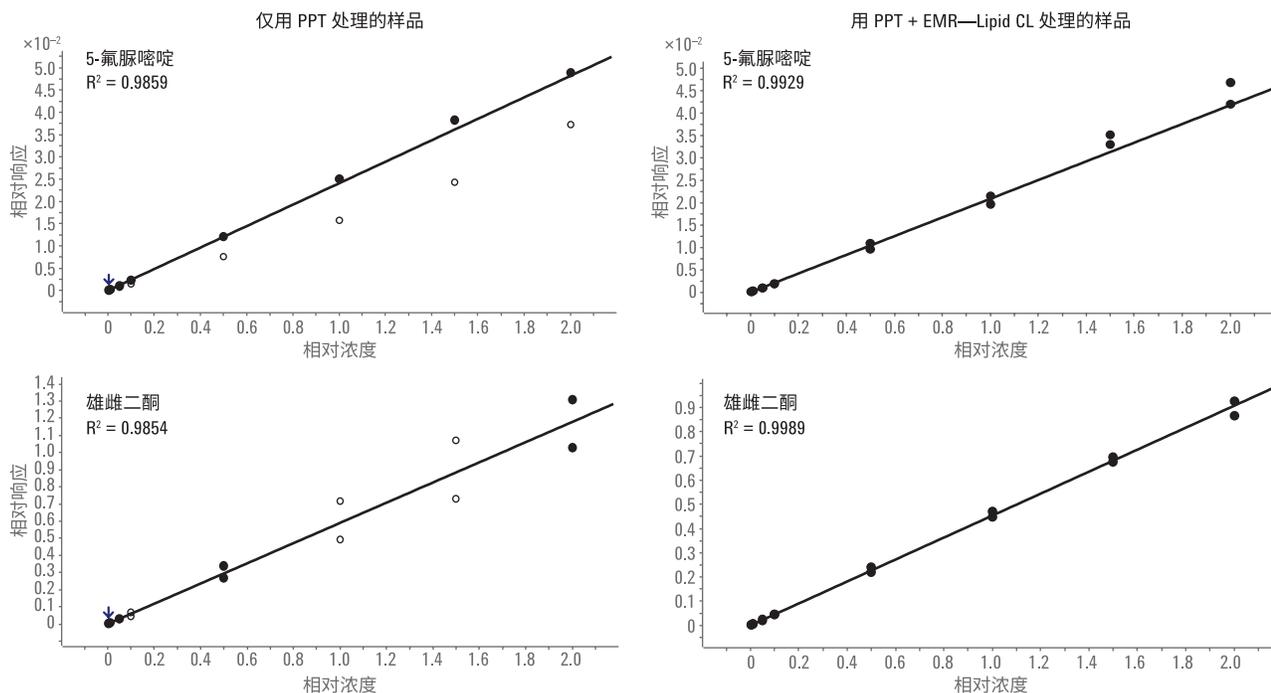


图 4. 对仅采用 PPT 以及先后采用 PPT 和 Agilent Captiva EMR—Lipid 净化的样品的重复校准曲线线性比较结果

表 4. 用时三日的准确度 (%Ac) 和精度 (%RSD) 运行 QC 样品日间结果汇总，每种浓度下的 n = 6

分析物		5-氟尿嘧啶		吉西他滨		安非他明		美托洛尔		氢化可的松		华法令		雌二醇		阿托伐他汀		双氯芬酸	
		%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD
LLOQ (0.5 ng/mL)	第 1 天	103.0	8.0	97.2	5.4	94.4	5.0	105.1	12.2	100.4	2.8	105.9	8.6	99.7	6.9	98.8	8.7	99.9	6.0
	第 2 天	97.4	5.9	87.2	5.6	93.2	9.5	93.8	9.7	87.5	10.4	87.5	5.1	86.0	10.5	103.5	6.5	90.3	11.3
	第 3 天	98.4	5.6	88.6	4.2	98.2	2.6	96.7	7.1	87.7	7.3	90.3	4.5	90.3	7.5	92.3	14.1	94.2	14.1
低 QC (2 ng/mL)	第 1 天	103.7	10.0	90.5	5.5	96.1	4.2	99.7	6.4	103.3	5.2	88.7	6.0	95.8	4.7	94.5	7.3	89.9	14.2
	第 2 天	97.4	6.5	87.2	7.5	93.2	3.6	93.8	3.6	87.5	4.1	87.5	8.6	86.0	7.0	103.5	6.1	90.3	15.0
	第 3 天	85.8	6.1	95.2	4.6	100.3	3.8	101.9	10.8	97.9	3.7	99.3	6.2	99.3	6.2	93.8	6.8	91.2	8.1
中 QC (50 ng/mL)	第 1 天	107.0	6.3	94.7	3.3	97.9	5.0	107.5	6.9	103.1	4.7	92.2	3.8	104.3	3.8	86.6	12.2	97.3	6.7
	第 2 天	101.5	7.1	94.3	7.0	100.5	5.0	102.5	9.5	92.5	14.6	97.7	10.4	97.7	3.4	95.9	13.0	93.3	6.5
	第 3 天	85.8	7.6	95.2	4.2	100.3	6.1	101.9	5.6	97.9	6.5	99.3	5.2	99.3	5.2	93.8	7.1	91.2	8.6
高 QC (150 ng/mL)	第 1 天	109.2	11.9	102.8	3.8	98.9	4.1	95.6	4.9	108.7	7.6	101.5	8.0	94.2	3.7	92.5	7.8	96.4	10.5
	第 2 天	104.4	5.6	99.4	9.3	100.0	5.1	92.3	5.1	101.7	7.8	105.1	6.6	93.4	6.5	93.4	5.1	94.8	6.1
	第 3 天	110.1	3.1	99.5	6.4	99.7	4.1	92.7	4.4	103.3	6.9	103.6	8.9	105.8	8.0	98.2	7.4	102.7	9.0
HLOQ (200 ng/mL)	第 1 天	108.7	4.3	106.9	4.3	101.1	5.6	101.3	8.4	112.5	2.6	107.0	8.4	97.6	3.6	85.4	14.2	93.1	4.5
	第 2 天	104.5	6.6	101.7	7.4	102.7	4.6	94.1	8.7	109.0	4.9	108.5	7.2	101.5	5.0	95.5	8.9	100.9	4.5
	第 3 天	100.5	6.4	100.7	3.9	99.5	4.6	90.0	1.8	107.3	6.0	110.6	6.7	110.6	6.7	105.8	5.9	110.0	3.4

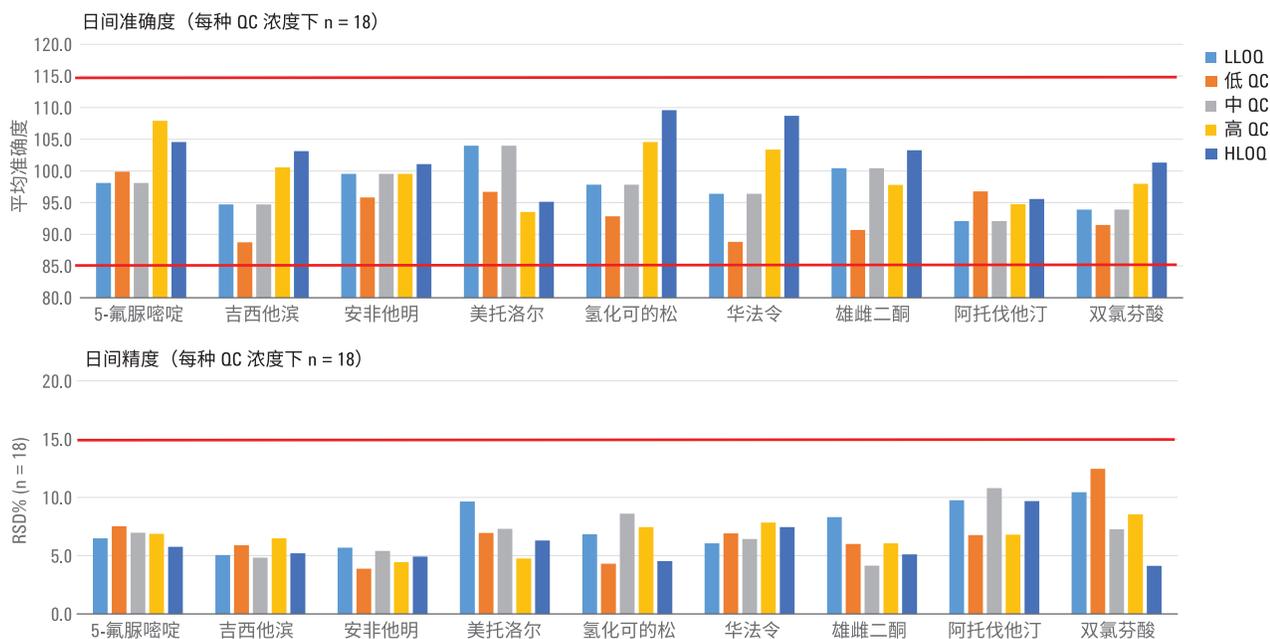


图 5. 方法验证日间准确度和精度结果汇总

在最低浓度校准标样之前运行基质空白，用于验证方法选择性。在 LLOQ 水平时，基质共洗脱干扰响应应当小于目标分析物响应的 20%。安非他明的色谱峰处有干扰，浓度为 0.5 ng/mL 时可能会产生 > 20% 的安非他明峰响应。血清空白中存在痕量的氢化可的松，但浓度为 0.5 ng/mL 时，其响应小于化合物响应的 20%。在最高浓度校准标样之后运行基质空白，评估交叉污染。雄烯二酮、阿托伐他汀和双氯芬酸通常显示一些交叉污染。通过延长针头冲洗时间、采用更长的后液相色谱梯度冲洗时间来解决痕量交叉污染的问题。

根据为期三天的准确度和精度运行结果，对采用一种方法测定多种药物化合物进行验证。在此验证方法中使用了 IS（内标）。一般来说，生物分析中强烈推荐稳定同位素标记的 IS。当没有稳定同位素标记的 IS 时，应采用结构相似的 IS 类似物<sup>4</sup>。在本

方法中，九种药物化合物中使用了两种 IS 化合物，并且仅安非他明具有稳定的同位素标记的 IS：安非他明-D5。安非他明-D5 和黄体酮-D9 用作其余化合物的 IS。不过，采用与多种化合物的结构无关的 IS 轻松验证了建立的方法，这得归功于干净的样品基质和影响较小的离子抑制效应。这一优势使得方法开发和验证变得更加简单、经济。

### 基质离子抑制效应

通过标样柱后注射研究对基质效应进行评估，在已处理的血清空白注入液相色谱柱后，采用连续柱后注射分析物对可能的基质效应进行了评估。分析物保留时间处或附近的任何信号强度的变化表明基质中存在干扰分析的物质。

分别进样仅由 PPT 处理、先后采用 PPT 及 Captiva EMR—Lipid 净化处理、以及先后采用 PPT 及其他脂质去除净化

处理的血清基质空白，进行柱后注射研究。图 6 将图谱重叠并与目标分析物色谱图进行对比，结果显示目标分析物中有不同程度的离子抑制。主要有三个区域可能存在离子抑制效应，保留时间 1–2 min（第一区）、保留时间 3.5–6 min（第二区）和保留时间 6.2–8 min（第三区）。第一区显示了所有曲线的抑制，可能由基质中的盐造成。第二区主要是由基质中的溶血磷脂引起，而第三区主要由基质中的甘油磷脂引起。经 PPT 和 Captiva EMR—Lipid 净化后的样品的谱图显示了平滑的分析物曲线，且在第二区和第三区没有明显下降，表明已高效地去除了磷脂。但是，仅由 PPT 处理和采用 PPT 及其他脂质去除产品净化的样品的谱图显示第二区和第三区中有明显下降，表明存在磷脂离子抑制效应。这些区域中目标分析物（特别是位于升降始末处的分析物）的离子抑制将影响这些分析物定量分析的方法可靠性。

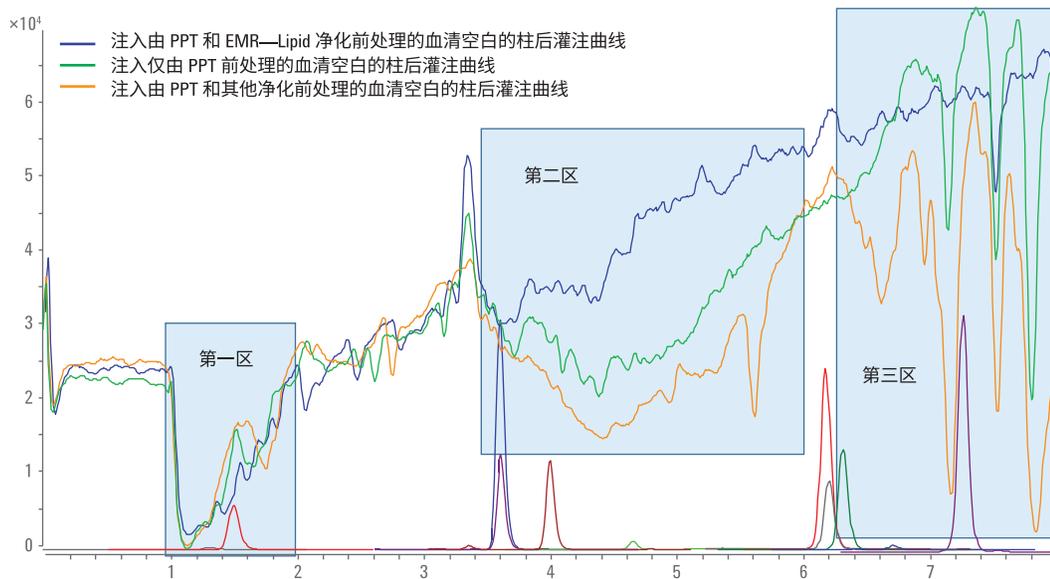


图 6. 标样柱后注射曲线对比以及基质离子抑制效应对目标分析物的影响

### Agilent Captiva EMR—Lipid 吸附剂的批次间重现性

采用装填有三个不同生产批次吸附剂的 1 mL 小柱，在 1 ng/mL 水平针对磷脂去除和分析物回收率方面评估了

Agilent Captiva EMR—Lipid 吸附剂的批次间重现性。所有三个批次的吸附剂对磷脂的去除率 > 99%。图 7 所示的一致分析物回收率结果也证明了 Captiva EMR—Lipid 吸附剂的一致性及批次间的重现性。

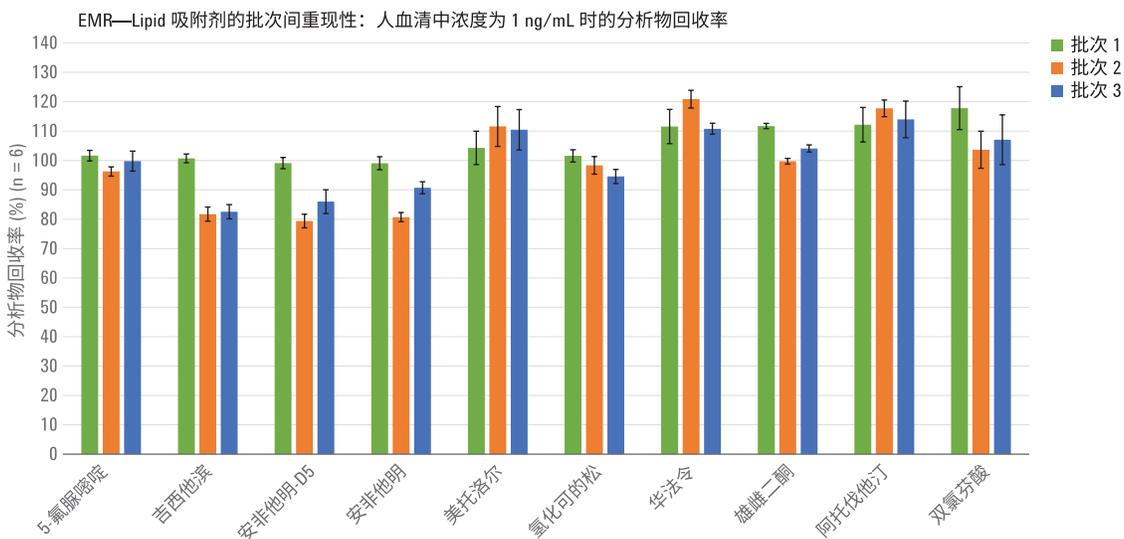


图 7. 人血清中浓度为 1 ng/mL 时的分析物回收率，验证了 Agilent Captiva EMR—Lipid 吸附剂批次间重现性

## 结论

本文验证了用于定量测定人血清中九种代表性药物化合物的样品前处理方法，该方法先后采用 PPT 和 Agilent Captiva 增强型脂质去除净化。用时三日的准确度和精度运行结果验证了该方法具有较宽的动态范围，重复的校准曲线具有可重现的线性，并且具有出色的日内和日间准确度和精度。标样柱后注射研究表明，与仅 PPT 和先后采用 PPT 和其他脂质去除净化相比，本方法显著减少了基质离子抑制效应。从出色的定量结果可以看出，干净的基质使得建立的方法更为可靠。干净的基质允许使用 IS 类似物甚至是结构不相干的 IS，而不必采用昂贵、稳定的同位素标记 IS，使得方法验证更轻松，样品分析更为经济。

## 参考文献

1. US Food and Drug Administration, *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* **2001**
2. Bylda, C.; Thiele, R. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *The Analyst* **2014**, *139*, 2265–2276
3. León, Z.; *et al.* Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, 831–843
4. Mulvana, D.E. Critical topics in ensuring data quality in bioanalytical LC-MS method development. *Bioanalysis* **2010**, *2*, 1051–1072
5. Michopoulos, F.; *et al.* Extraction methods for the removal of phospholipids and other endogenous material from a biological fluid. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 2747–2755
6. Zhao, L.; Lucas, D. Efficiency of Biological Fluid Matrix Removal using Captiva EMR—Lipid Cleanup. (使用 Captiva EMR—Lipid 净化去除生物体液基质的效率) 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-8006EN, **2017**
7. Bonfiglio, R.; *et al.* The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 1175–1185

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线:

**800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)**

联系我们:

**LSCA-China\_800@agilent.com**

在线询价:

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

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

本文信息如有变更, 恕不另行通知

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017  
2017 年 4 月 27 日, 中国出版  
5991-8007CHCN



**Agilent Technologies**