

胆碱能受体拮抗剂类吸入粉雾剂化合物LC-MRM定量灵敏度的提高

Improved LC-MRM Quantification Sensitivity for Powder for Inhalation of the Cholinergic Antagonist Family

SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP® Ready配置SCIEX OS软件

钟晨春, 龙志敏

SCIEX中国, 应用支持中心

Keywords: Quantification, Glycopyrrolate Bromide, Tiotropium Bromide, Cholinergic Antagonist, Inhalation, MRM, Triple Quad 7500

慢性阻塞性肺疾病（简称：慢阻肺）是世界卫生组织（WHO）列出的全球五大慢性非传染性疾病之一¹。数据显示，我国慢阻肺患病人数近一亿，但在知晓率和诊断率方面仍远不理想，规范性治疗方面也有巨大提升空间²。支气管舒张剂是慢阻肺症状管理的中心²，能够有效改善肺功能、提高生活质量。其中，长效 β_2 受体激动剂（LABA）和长效胆碱能受体拮抗剂（LAMA）是两种常用的吸入型支气管扩张剂，可以显著改善患者肺功能、呼吸困难、健康状况，并降低急性加重发生率³。由于药效活性优异，这些化合物给药剂量通常相对较低，给药后人体血中药物浓度最大值（Cmax）约为200-300 pg/mL⁴，准确定量对体内暴露水平测定和动态变化过程评价的要求很高，需要检测仪器有极高的灵敏度。在以往的测定中需要尽量提高进样体积以及严苛的前处理过程来达到测定的需求，费时费力。

在本项研究中，选择了来自胆碱能受体拮抗剂类的两个化合物：格隆溴铵（Glycopyrrolate Bromide）和噻托溴铵（Tiotropium Bromide）作为模型化合物用于SCIEX 7500系统的定量性能测试。OptiFlow™ Pro离子源结合D Jet™离子导向技术的使用使得胆碱能受体拮抗剂类化合物定量灵敏度显著提高。通过对离子去溶剂化和离子聚焦过程的优化，使得多重反应监测模式（Multiple Reaction Monitoring, MRM）检测性能得以提高。在10 μ L体积进样下，格隆溴铵和噻托溴铵在血浆中的定量限为0.1 pg/mL。在获得优异灵敏度的同时，出色的分析重现性、准确性和定量线性使得整个分析流程更加可靠。

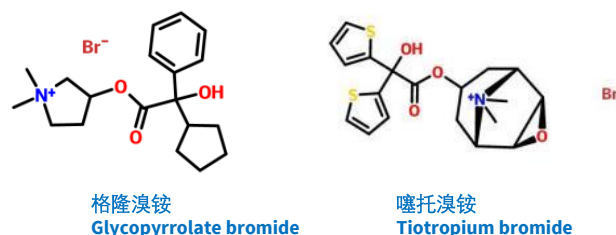


图1. 格隆溴铵和噻托溴铵的化合物结构。

基于SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP® Ready定量检测胆碱能受体拮抗剂类化合物方法的主要特点

- 血浆中胆碱能拮抗剂类化合物（格隆溴铵和噻托溴铵）定量限均为0.1 pg/mL，该分析方法重现性、准确性和定量线性良好
- 硬件提升包括：
 - D Jet离子导向技术——不损失耐受性的情况下捕获更多离子⁵
 - OptiFlow Pro离子源——新一代的离子源技术，不需要手动调整，即可在各种条件下均实现优异的灵敏度
 - E Lens™技术——通过提高电场作用产生更多离子，并提高带电液滴去溶剂化作用，以实现大气压电喷雾电离（Electron Spray Ionization, ESI）模式分析时灵敏度的提升
- SCIEX OS软件用于数据采集和数据处理——集合数据采集、处理、管理于一体，方便客户使用

实验方法

样品前处理: 1 mL空白血浆经过3 mL乙腈溶液沉淀处理后, 上清加入10 mL纯水稀释, 全部稀释后的溶液经过活化好的固相萃取小柱处理后, 用1 mL 50%乙腈水溶液等洗脱, 洗脱液作为处理过的血浆基质溶液。格隆溴铵和噻托溴铵加入处理过后的血浆基质溶液。通过用处理过后的血浆基质溶液进行连续稀释制备标准曲线样品用于分析。

液质联用条件: 样品通过串联ExionLC™液相的SCIEX Triple Quad™ 7500 系统-QTRAP® Ready进行三次平行分析。详尽方法列于表1和2。

数据处理: 数据通过SCIEX OS 2.0软件中的定量功能(点击“Analytics”)进行处理。

胆碱能受体拮抗剂类化合物定量结果

SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP® Ready通过创新的硬件设计实现仪器检测灵敏度的提高。⁵ OptiFlow Pro离子源整合E Lens技术形成通用的几何学设计, 不需要调整位置只需要更换用于微流或常规流速的喷嘴即可进行流速1 μL/min到3000 μL/min的分析。⁵ E Lens技术在ESI喷嘴处形成更强的电场力作用, 提升了

表1. 色谱条件

参数	数值
色谱柱	Welch Ultimate XB-C18 (5 μm, 50 × 2.1 mm)
流动相A	含10 mM碳酸氢铵的水
流动相B	乙腈
流速	1 mL/min
柱温	40°C
进样体积	10 μL

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0	80	20
1.5	30	70
1.6	5	95
2.2	5	95
2.3	80	20
4	80	20

表2. SCIEX 7500系统的质谱参数

参数	数值	参数	数值
气帘气	45 psi	源温度	650 °C
雾化气	32 psi	辅助气	70 psi
碰撞诱导解离气	10	离子喷雾电压	1500 V

名称	Q1	Q3	碰撞能量	碰撞池出口电压
格隆溴铵	318.2	116.1	34	15
噻托溴铵	392.1	152.1	38	8

离子从带电液滴中释放的效率, 并使更多的离子偏转进入锥孔以提升检测灵敏度。⁵ 在锥孔挡板后的D Jet离子导向设置可以提高在高真空环境中离子的捕获和传输效率。锥形渐缩设计的十二极杆能有效地将离子聚焦进入下一级的QJet™离子导向。⁵

通过以上技术的整合, 使得离子化效率和离子聚焦得以提升, 进而我们在SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP® Ready实现检测灵敏度的提高。

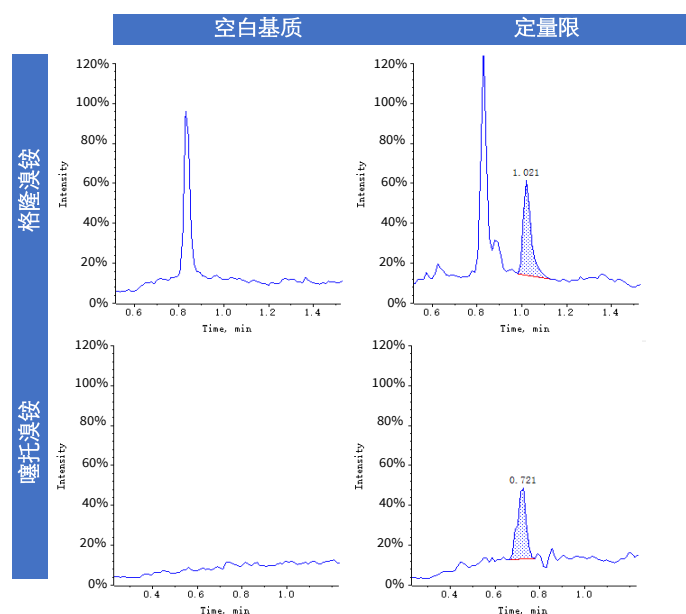


图2. 血浆中典型的格隆溴铵和噻托溴铵MRM提取离子流图。

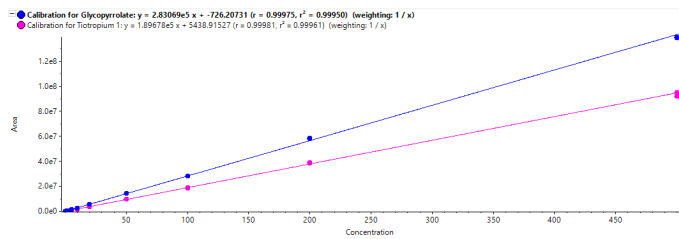


图3. 血浆中格隆溴铵和噻托溴铵0.1-500 pg/mL的标准曲线

Row	Component N...	Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
1	Glycopyrrolate	0.10	3 of 3	0.10	0.00	1.75	104.01
2	Glycopyrrolate	0.20	3 of 3	0.20	0.01	5.09	97.93
3	Glycopyrrolate	0.50	3 of 3	0.50	0.01	2.67	99.70
4	Glycopyrrolate	1.00	3 of 3	0.96	0.01	1.17	95.82
5	Glycopyrrolate	2.00	3 of 3	1.98	0.04	2.05	99.20
6	Glycopyrrolate	5.00	3 of 3	5.01	0.03	0.51	100.14
7	Glycopyrrolate	10.00	3 of 3	9.68	0.03	0.27	96.76
8	Glycopyrrolate	20.00	3 of 3	20.40	0.15	0.74	102.00
9	Glycopyrrolate	50.00	3 of 3	51.38	0.40	0.77	102.76
10	Glycopyrrolate	100.00	3 of 3	99.88	0.36	0.36	99.88
11	Glycopyrrolate	200.00	3 of 3	206.89	1.01	0.49	103.44
12	Glycopyrrolate	500.00	3 of 3	491.83	0.65	0.13	98.37

Row	Component N...	Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
1	Tiotropium 1	0.10	3 of 3	0.10	0.01	5.30	103.04
2	Tiotropium 1	0.20	3 of 3	0.19	0.00	2.54	96.74
3	Tiotropium 1	0.50	3 of 3	0.53	0.01	2.17	105.06
4	Tiotropium 1	1.00	3 of 3	0.98	0.01	1.44	98.49
5	Tiotropium 1	2.00	3 of 3	1.98	0.02	0.93	99.07
6	Tiotropium 1	5.00	3 of 3	4.97	0.04	0.89	99.33
7	Tiotropium 1	10.00	3 of 3	9.53	0.14	1.49	95.32
8	Tiotropium 1	20.00	3 of 3	20.11	0.10	0.47	100.53
9	Tiotropium 1	50.00	3 of 3	50.85	0.40	0.78	101.70
10	Tiotropium 1	100.00	3 of 3	99.11	0.43	0.44	99.11
11	Tiotropium 1	200.00	3 of 3	205.10	1.14	0.55	102.55
12	Tiotropium 1	500.00	3 of 3	495.35	9.15	1.85	99.07

图4. 血浆中格隆溴铵和噻托溴铵的定量信息总结

如图2、图3和图4所示，在血浆中格隆溴铵和噻托溴铵的定量下限为0.1 pg/mL，在整个定量范围（0.1-500 pg/mL）内重现性差异小（CV<5.30%），准确度高（95-109%）。500 pg/mL为此样品配制的最高浓度，但由于500 pg/mL并未出现信号饱和，故定量上限可能更高。

结论

- 本文在SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MSMS系统 - QTRAP® Ready上建立了胆碱能受体拮抗剂类化合物定量的方法，该方法灵敏度高。
- 格隆溴铵和噻托溴铵在血浆中的定量下限为0.1 pg/mL，分析方法重现性、准确度、定量线性良好。
- 在配有E Lens技术的OptiFlow Pro离子源和D Jet离子导向技术的加持下灵敏度有显著提高。

参考文献

1. <https://www.who.int/ncds/en>.
2. Wang C, Xu J, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study[J]. Lancet. 2018, 391(10131):1706-1717.
3. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease 2020 report[J]. <https://goldcopd.org/gold-reports/>
4. Vaidya S, et al. Pharmacokinetics of indacaterol, glycopyrronium and mometasone furoate following once-daily inhalation as a combination in healthy subjects. Pulm Pharmacol Ther 2020 10;64.
5. Enabling new levels of quantification. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11886-A.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13160-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835