



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119861166 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 22

(21) 申请号 202411857382.X

(22) 申请日 2020.05.29

(30) 优先权数据

62/855,636 2019.05.31 US

(62) 分案原申请数据

202080040211.1 2020.05.29

(71) 申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 W-L·庄 F·G·洛佩斯

J·帕切科 G·桑德林克

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int. Cl.

G01N 30/46 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

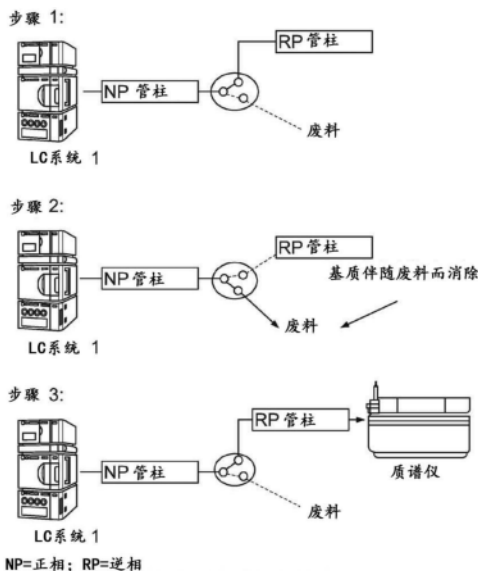
权利要求书2页 说明书14页 附图4页

(54) 发明名称

二维LC-MS/MS系统

(57) 摘要

本发明涉及二维LC-MS/MS系统,提供了一种通过连续流式2DLC-MS/MS使用单一LC系统来检测源样品中的一或多种分析物的新颖分析方法。



1. 一种用于监测有此需要的受试者的血液样品中的一种或多种脂质生物标记物的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 利用萃取溶剂自所述血液样品萃取所述一种或多种脂质生物标记物以获得萃取样品;

(b) 利用LC泵系统将所述萃取样品及溶剂系统施加至第一液相层析(LC)管柱,其中所述第一LC管柱经由具有分流阀的套管直接连接至第二LC管柱;

(c) 在第一预定时间处将所述分流阀设定至第一位置,使得将来自所述第一LC管柱的溶剂流出物导引至废料;

(d) 在第二预定时间处将所述分流阀设定至第二位置,使得来自所述第一LC管柱的溶剂流出物进入所述第二LC管柱以供进一步分离;

(e) 视需要,重复步骤(c)及(d);及

(f) 分析获自所述第二LC管柱的层析分离的样品,

其中所述方法仅使用一个LC泵系统用于两个LC管柱。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(f)包括使用质谱(MS)来分析获自所述第二LC管柱的所述层析分离的样品。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述MS为串联MS。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述LC为高效液相层析或超高效液相层析。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一LC管柱为正相管柱且所述第二LC管柱为反相管柱,或反之亦然。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述溶剂系统包括甲醇、乙腈及水中的一者或多者。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述溶剂系统进一步包含乙酸铵及/或甲酸。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述溶剂系统的组分的相对比率在单一样品运行期间变化。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者患有溶酶体贮积病或处于发生溶酶体贮积病的风险。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述溶酶体贮积病是法布立病、高歇氏病、克拉培病及酸性鞘磷脂酶缺乏症(ASMD)。

11. 根据权利要求9或10所述的方法,其中所述受试者正在用酶替换疗法治疗或需要酶替换疗法。

12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述溶酶体贮积病是ASMD,任选地其中所述一种或多种脂质生物标记物包含神经酰胺和/或溶血性鞘磷脂。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述一种或多种脂质生物标记物是利用包含80%甲醇(v/v)、15-20%乙腈(v/v)、0-5%水(v/v)、10mM乙酸铵及1%甲酸的萃取溶剂自血液样品萃取的。

14. 根据权利要求9-13中任一项所述的方法,其中所述第一LC管柱是二氧化硅管柱,且所述第二LC管柱是C18管柱。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述溶剂系统包含0.5%三氟乙酸。

16. 根据权利要求14或15所述的方法,其中施加至所述第一LC管柱及所述第二LC管柱的溶剂系统包含0-85%甲醇(v/v)、0-15%乙腈(v/v)及0%-100%水(v/v)。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述溶剂系统是通过混合包含水及0.5%三氟乙酸的第一溶剂以及包含85%甲醇(v/v)、15%乙腈(v/v)及0.5%三氟乙酸的所述第二溶剂而获得的,任选地其中所述第一溶剂与所述第二溶剂的比率为70:30、85:15或99:1。

二维LC-MS/MS系统

[0001] 本发明申请是基于申请日为2020年05月29日,申请号为202080040211.1(国际申请号为PCT/US2020/035231)、名称为“二维LC-MS/MS系统”的发明专利申请的分案申请。

【技术领域】

[0002] 本申请要求提交于2019年5月31日的美国临时申请62/855,636的优先权,其内容整体以引证方式并入本文中。

【背景技术】

[0003] 液相层析串联质谱分析(LC-MS/MS)作为用于检测及测量广泛多种分析物的强大技术出现。其迅速变为用于准确且精确定量来自生物基质的分析物的方法选择。对来自生物基质的样品进行LC-MS/MS分析的主要障碍为存在干扰存在于这些基质中的所关注分析物的鉴别及定量的主要基质组分,诸如磷脂、蛋白质或核苷酸(参见例如,Carmical及Brown,Biomed.Chromatogr.A(2016)30:710-20;及Massood等人,Lipids(2012)47:209-26)。发展生物分析方法的基本步骤需要清洁样品以在样品分析之前消除主要基质杂质。用于样品清洁的方法大致分类为“脱机(offline)”(其为指人工样品制备程序)或“在线(online)”(其为指通过液相层析(LC)系统进行的样品制备程序)(Afonso-Olivares等人,J Chromatogr.(2017)1487:54-63;Mokh等人,Sci Total Environ.(2017)609:830-41;及Dong等人,Bioanalysis(2015)7:2227-33)。

[0004] 最常见脱机样品清除方法中的一者为固相萃取(SPE),其专注于消除基质组分且使用样品制备筒富集所关注分析物(Vanol等人,Biomed.Chromatogr.(2017)32:1-10;亦参见Afonso-Olivares,Mokh及Dong,见上文)。含有所关注分析物的SPE萃取物经干燥且复原于另一溶剂系统中,该溶剂系统需要与一维(1D)LC-MS/MS分析兼容。干燥且复原样品于不同溶剂系统中的方法称为“溶剂交换”或“缓冲液交换”。此过程为必需的,此为因为用于SPE的溶剂系统通常不与用于1D LC-MS/MS分析的溶剂系统兼容。溶剂交换过程导致样品损失及可再现性降低。此外,SPE筒成本高且过程耗时。为了消除用于样品清除的SPE步骤,已开发在线二维(2D)LC-MS/MS。2D LC-MS/MS使用双管柱系统。通常由亲水性树脂(正相层析)制成的第一管柱用于在将所关注样品引入至第二管柱之前消除主要基质杂质。第二管柱可由疏水性树脂(反相层析)制成且在引入至质谱仪之前自其他干扰分子进一步解析出所关注分析物(Iguiniz and Heinisch,J Pharmaceut Biomed Anal.(2017)145:482-503;Ling等人,Biomed.Chromatogr.(2014)28:1284-93;Pirok等人,Anal Chem.(2019)91:240-63;及Iguiniz等人,Talanta.(2019)195:272-80)。因此,对于传统在线2D LC-MS/MS分析型方法,采用两个不同溶剂系统。此需要针对各管柱的专用泵系统以及允许分析物转移及溶剂交换的多埠分流阀。这些要求使得传统2D LC-MS/MS方法极复杂且昂贵,胜过2D LC-MS/MS的潜在益处。大部分实验室未配备以进行此类型分析。

[0005] 因此,仍需要精确且又简单的经改良分析方法。

【发明内容】

[0006] 本公开内容提供一种用于分析源样品中的一或多种分析物的新颖2D LC分析方法。该方法包含以下步骤：(a) 利用萃取溶剂自该源样品萃取该一或多种分析物，获得萃取样品；(b) 利用LC系统将该萃取样品及溶剂系统施加至第一液相层析(LC)管柱，其中该第一LC管柱经由具有分流阀的套管直接连接至第二LC管柱；(c) 在第一预定时间处将该分流阀设定至第一位置，使得将来自该第一LC管柱的溶剂流出物导引至废料；(d) 在第二预定时间处将该分流阀设定至第二位置，使得来自该第一LC管柱的该溶剂流出物进入该第二LC管柱以供进一步分离；(e) 视需要，重复步骤(c)及(d)；及(f) 分析获自该第二LC管柱的层析分离的样品。LC系统为指具有用于将溶剂系统输入至LC管柱的泵系统的LC仪器。通过“直接地”意谓不存在专用于第二管柱的第二LC系统，且因此本发明方法对于二维仅利用一个LC系统。在一些实施方案中，步骤(f) 包含使用质谱分析(MS) (诸如串联MS) 来分析获自该第二LC管柱的该层析分离的样品。

[0007] 在一些实施方案中，该LC为高效液相层析或超高效液相层析。在一些实施方案中，该第一LC管柱为正相管柱且该第二LC管柱为反相管柱，或反之亦然。

[0008] 在一些实施方案中，2D LC的该溶剂系统包含甲醇、乙腈及水中的一或多者。在另外的实施方案中，该溶剂系统进一步包含乙酸铵及/或甲酸。

[0009] 通过“溶剂系统”意谓在用于分析目标分析物的LC运行期间使用的溶剂混合物或组合。在运行期间，溶剂组合物可变化(例如，通过改变溶剂混合物的组分的相对比率)，但在样品自第一管柱行进至第二管柱时，该变化不会使得需要对样品进行溶剂交换。在一些实施方案中，该溶剂系统的组分的相对比率在样品运行期间不同。

[0010] 该源样品可为生物样品，诸如组织样品、血清、血浆、血液、干血点、尿液、唾液、痰、眼泪、脑脊髓液、精液或粪便。在一些实施方案中，该一或多种分析物为蛋白质、脂质、碳水化合物、核苷酸、代谢物、维生素、激素或类固醇。

[0011] 该一或多种分析物为神经酰胺及溶血性神经鞘磷脂，且该源样品为来自患有酸性鞘磷脂酶缺乏症的患者的血液。在另外的实施方案中，该神经酰胺及该溶血性神经鞘磷脂为利用萃取溶剂萃取自血液样品，该萃取溶剂包含80%甲醇(v/v)、15-20%乙腈(v/v)、0-5%水(v/v)、10mM乙酸铵及1%甲酸。在特定实施方案中，该第一LC管柱为二氧化硅管柱且该第二LC管柱为C18管柱(亦即，管柱的树脂由具有18个碳的聚合物制成)。在另外的实施方案中，该溶剂系统包含0.5%三氟乙酸。

[0012] 在一些实施方案中，施加至该第一LC管柱及该第二LC管柱的该溶剂系统包含0-85%甲醇(v/v)、0-15%乙腈(v/v)及0-100%水(v/v)。在另外的实施方案中，该溶剂系统为通过混合包含水及0.5%三氟乙酸的第一溶剂及包含85%甲醇(v/v)、15%乙腈(v/v)及0.5%三氟乙酸的第二溶剂制成。在某些实施方案中，该第一溶剂与该第二溶剂的比率为70:30、85:15或99:1。

[0013] 在以下实施方式中本发明的其他特征、目标及优势显而易见。然而，应理解，实施方式虽然指示本发明的实施方案及方面，但仍仅借助于说明而非限制的方式给出。对于本领域技术人员而言，在本发明的范畴内的各种变化及修改将自实施方式而变得显而易见。

[0014] 具体地，本申请包括但不限于如下各项：

[0015] 1. 一种用于分析源样品中的一或多种分析物的方法，其包含以下步骤：

- [0016] (a) 利用萃取溶剂自该源样品萃取该一或多种分析物,获得萃取样品;
- [0017] (b) 利用LC系统将该萃取样品及溶剂系统施加至第一液相层析(LC)管柱,其中该第一LC管柱经由具有分流阀的套管直接连接至第二LC管柱;
- [0018] (c) 在第一预定时间处将该分流阀设定至第一位置,使得将来自该第一LC管柱的溶剂流出物导引至废料;
- [0019] (d) 在第二预定时间处将该分流阀设定至第二位置,使得来自该第一LC管柱的该溶剂流出物进入该第二LC管柱以供进一步分离;
- [0020] (e) 视需要,重复步骤(c)及(d);及
- [0021] (f) 分析获自该第二LC管柱的层析分离的样品。
- [0022] 2. 如项1的方法,其中步骤(f)包含使用质谱分析(MS)来分析获自该第二LC管柱的该层析分离的样品。
- [0023] 3. 如项2的方法,其中该MS为串联MS。
- [0024] 4. 如前述项中任一项的方法,其中该LC为高效液相层析或超高效液相层析。
- [0025] 5. 如前述项中任一项的方法,其中该第一LC管柱为正相管柱且该第二LC管柱为反相管柱,或反之亦然。
- [0026] 6. 如前述项中任一项的方法,其中该溶剂系统包含甲醇、乙腈及水中的一或多者。
- [0027] 7. 如项6的方法,其中该溶剂系统进一步包含乙酸铵及/或甲酸。
- [0028] 8. 如前述项中任一项的方法,其中该溶剂系统的溶剂组分的组分的相对比率在单一样品运行期间变化。
- [0029] 9. 如前述项中任一项的方法,其中该源样品为生物样品。
- [0030] 10. 如项9的方法,其中该生物样品为组织样品、血清、血浆、血液、干血点、尿液、唾液、痰、眼泪、脑脊髓液、精液或粪便。
- [0031] 11. 如项9或10的方法,其中该一或多种分析物为蛋白质、脂质、碳水化合物、核苷酸、代谢物、维生素、激素或类固醇。
- [0032] 12. 如项11的方法,其中该一或多种分析物为神经酰胺及溶血性神经鞘磷脂,且该源样品为来自患有酸性鞘磷脂酶缺乏症的患者的血液。
- [0033] 13. 如项12的方法,其中该神经酰胺及该溶血性神经鞘磷脂为利用萃取溶剂萃取自血液样品,该萃取溶剂包含80%甲醇(v/v)、15-20%乙腈(v/v)、0-5%水(v/v)、10mM乙酸铵及1%甲酸。
- [0034] 14. 如项12或13的方法,其中该第一LC管柱为二氧化硅管柱,且该第二LC管柱为C18管柱。
- [0035] 15. 如项14的方法,其中该溶剂系统包含0.5%三氟乙酸。
- [0036] 16. 如项14或15的方法,其中施加至该第一LC管柱及该第二LC管柱的该溶剂系统包含0-85%甲醇(v/v)、0-15%乙腈(v/v)及0%-100%水(v/v)。
- [0037] 17. 如项16的方法,其中该溶剂系统可通过混合包含水及0.5%三氟乙酸的第一溶剂及包含85%甲醇(v/v)、15%乙腈(v/v)及0.5%三氟乙酸的第二溶剂获得。
- [0038] 18. 如项17的方法,其中该第一溶剂与该第二溶剂的比率为70:30、85:15或99:1。

【附图说明】

[0039] 图1为展示传统在线2D LC-MS/MS的设定的示意性图示。

[0040] 图2为关于脱机1D LC-MS/MS、传统在线2D LC-MS/MS及当前在线连续流式2D LC-MS/MS(单一LC系统)的设定的比较。

[0041] 图3为说明当前连续流式2D LC-MS/MS方法的示意性图示。

[0042] 图4说明使用当前连续流式2D LC-MS/MS方法的神经酰胺及溶血性神经鞘磷脂(溶血性SPM)的分析。神经酰胺及溶血SPM在此方法中与污染性磷脂分离。

【实施方式】

[0044] 本公开内容提供一种通过连续流式二维液相层析-串联质谱分析(2DLC-MS/MS)同时分析源样品中的多种分析物的新颖方法。在当前2DLC-MS/MS方法中,单一溶剂系统用作萃取溶剂以及2D LC-MS/MS分析的两个维度的移动相。在分析运行的2D LC部分期间,将两个管柱之间的分流阀以定时方式切换至不同位置,以便导引自第一管柱溶剂流动至废料或第二管柱以供进一步分离。因此,当允许使用两个或更多个液相层析(LC)管柱时,此方法仅需要一个LC泵系统(亦即,LC系统),此为因为该方法绕过对溶剂交换的需求。另外,本发明方法中的溶剂流动为连续的,不间杂有任何溶剂交换步骤或第二LC系统。相比的下,传统2D LC-MS/MS利用具有两个不同溶剂系统(例如一个极性且另一个非极性)的两个分离机制。因此,需要两个LC系统。

[0045] 本发明方法的一个大优点为消除第二泵系统且随后简化2D LC-MS/MS设定(例如,使用具有更少埠的分流阀)。消除第二泵系统大大地降低装备成本及方法进展时间。此创新允许2D LC-MS/MS分析在当前正在进行常规1DLC-MS/MS分析的任何实验室中进行。该创新为分析实验室增加可挠性,从而允许其使用相同测试设备而选择进行1D或2D LC-MS/MS分析。系统的简化使得人员培训更快、降低分析故障的几率且减少样品周转时间。此方法亦适用于多任务处理,此可显著降低样品制备及分析时间以及取样偏差,且改良可再现性。此外,此处所描述的新颖2D-LC方法可容易地调适成对除质谱仪之外的检测器起作用,诸如带电气溶胶检测器(CAD)、光散射检测器或UV检测器。此可挠性大大地增加当前分析方法的可应用性。

[0046] 由于这些改良,当前分析方法将允许2D LC-MS/MS技术广泛地用于生物化学分析领域中以用于生物医药研究、医疗诊断及环境研究。

[0047] 样品制备

[0048] 本发明方法可用于分析(例如,检测及/或定量)任何样品基质中的一或多种所关注分析物,该样品基质诸如生物或环境样品。生物样品可为来自人类、植物、动物或任何活细胞器的样品,诸如细胞及组织培养物、组织切片、全血、干血点、血浆、脱蛋白的血浆、血清、脱蛋白的血清、精液、痰、尿液、粪便、汗液、唾液、胆汁、泪液、脑脊髓液、来自身体部位的拭子、皮肤及毛发。环境样品可为空气样品、土壤样品、水样品、食品样品及任何材料样品。所关注分析物可为例如小分子,诸如药物物质;及生物分子,诸如多肽、肽、核酸、脂质或脂肪酸、碳水化合物、激素、维生素、类固醇及代谢物。

[0049] 为了在将样品施加至2D LC系统之前移除大部分杂质及干扰材料,所关注分析物可通过过滤、沉淀、离心、萃取、稀释或其组合经富集且分离。借助于实施例,所关注分析物

通过固相萃取 (SPE) 自源样品富集。SPE 通过使用样品制备筒富集所关注分析物。含有分析物的 SPE 萃取物可经干燥且复原于与 2D LC 系统兼容的溶剂系统中。若 SPE 萃取溶剂与 2D LC 系统兼容, 则如在本发明方法的一些实施方案中, 不需要干燥及复原步骤。

[0050] 所关注分析物亦可通过液-液萃取 (LLE) 自源样品萃取。LLE 用于基于其在两种不可混溶或部分可互溶液体, 通常极性溶剂 (如水) 及非极性有机溶剂中的相对溶解性来分离分析物。目标分析物首先由溶剂分配, 之后其经萃取、浓缩及稀释。

[0051] 所关注分析物亦可通过固体负载型液-液萃取 (SLE) 自源样品萃取。在 SLE 中, 将源样品的水溶液装载于包含硅藻土的载体上。在样品吸收至载体之后, 将其用诸如甲基第三丁基醚的有机萃取溶剂洗涤若干次。在所关注分析物已分配于有机相中之后, 其在复原于 2D LC 系统兼容的溶剂 (诸如 50:50 甲醇: 水溶液) 中之前通过干燥浓缩。

[0052] 若所关注分析物为蛋白质, 则其亦可通过蛋白质沉淀萃取 (PPE) 自源样品富集。蛋白质沉淀方法可包括去盐、等电点沉淀及有机溶剂萃取。借助于实施例, 通过去盐制备源样品以用于 2D LC 负载。此蛋白质沉淀技术依赖于蛋白质响应于诸如硫酸铵的中性盐的浓度增加而自溶液中“盐析出”。在另一实施例中, 源样品为通过等电点沉淀制备; 此方法可用于沉淀杂质蛋白质, 而非目标蛋白质。等电点 (pI) 为蛋白质的净初级电荷变为零的 pH。对于大部分蛋白质, pI 处于 4-6 的 pH 范围中。诸如盐酸及硫酸的无机酸可用作沉淀剂。等电点沉淀的潜在缺点为由无机酸造成的不可逆变性。

[0053] 用于自源样品萃取且富集所关注分析物的溶剂可与 2D LC 系统兼容。亦即, 可将含有萃取分析物的萃取溶剂直接地装载至 2D LC 系统而不需要溶剂交换。在一些实施方案中, 生物分子 (例如, 多肽、肽、核酸、脂质、激素、维生素、类固醇及碳水化合物) 的萃取溶剂包含甲醇、乙腈及/或水, 其中此三种物质的比率可视所关注分析物而不同。举例而言, 为了自血液样品或组织萃取脂质, 溶剂包含总体积百分比为 100% 的甲醇、乙腈及水的混合物, 例如约 30-100% 甲醇 (v/v)、约 0-100% 乙腈 (v/v) 及约 0-50% 水 (v/v)。视需要, 溶剂可含有其他成分, 例如 10mM 乙酸铵及 1% 甲酸。举例而言, 萃取溶剂可含有 80% 甲醇、15% 乙腈、5% 水、10mM 乙酸铵及 1% 甲酸; 或可含有 80% 甲醇、20% 乙腈、10mM 乙酸铵及 1% 甲酸。亦参见 Chuang 等人, *Methods Mol Biol.* (2016) 1378:263-72。特定溶剂组合物将视目标分析物及干扰基质特性而定。

[0054] 二维液相层析

[0055] 一旦源样品已通过例如富集所关注分析物处理, 则可将经处理样品输入至液相层析泵系统中以供施加至第一液相层析管柱。

[0056] 液相层析 (LC) 为一种在流体溶液 (移动相) 通过毛细作用渗透通过细微粉碎的物质 (固定相) 的管柱时选择性地滞留流体溶液的一或多种组分的过程。由固定相滞留流体溶液中的选择性组分由组分对固定相的亲合力高于对移动相的亲合力造成。如本文中所使用的液相层析包括 (但不限于) 高效液相层析 (HPLC)、超高效液相层析 (UHPLC)、高湍流液相层析 (HTLC)、正相层析 (NPC)、反相层析 (RPC)、超临界流体层析 (SFC)、亲和性层析、离子交换层析 (IEX)、毛细管液相层析、电层析、膜层析、整体层析 (monolith chromatography)、奈米及毛细管液相层析及尺寸排阻层析 (SEC)。所关注分析物可由固定相滞留且随后洗脱, 或可在不被滞留的情况下流动通过固定相。可基于滞留时间、峰强度及峰面积通过各种方式 (例如, UV、荧光、光散射或导电性) 来监测洗脱液或流出物中的分析物。可利用如下文所描述的

技术(诸如质谱分析)进行分析物的更详细分析。

[0057] 液相层析(LC)系统通常包含以下组件中的一些或全部。

[0058] (i) 注射器:亦称为样品管理器或自动取样器,注射器为用于将源样品引入至将其转移至LC管柱中的移动相中。

[0059] (ii) 储集器:溶剂储集器收容用于液相层析分离的溶剂系统(移动相)。

[0060] (iii) 泵:高压泵通常用于产生且维持指定流速的移动相。传统上,各LC管柱需要专用泵系统

[0061] (iv) 管柱:LC管柱包括用于接收样品的入口埠及用于释出流出物的出口埠,且通常装填有固体吸附剂介质,诸如二氧化硅、聚合物及其他树脂。LC管柱可为例如正相管柱(通常亲水性)、反相管柱(通常疏水性)、阳离子交换管柱、阴离子交换管柱、尺寸排阻层析管柱、膜管柱、整体管柱、奈米或毛细管LC管柱及手性层析管柱。

[0062] (v) 阀:分流器或切换阀为管柱与通过管柱的洗脱液或流出物的下一目的地之间的高压阀。下一目的地可为例如废料收集器或分析物检测器。分流器(或分流)阀可人工地或通过计算机控制,且可任选包括捕集管柱。通常,用于LC系统中的分流阀可具有多达12个埠。

[0063] (vi) 附件:高压套管及配件用于互连样品注射器、溶剂储集器、泵、管柱及检测器以形成移动相的管道。

[0064] 2D LC系统具有两个具有两个正交分离机制的LC管柱。第一LC管柱称为第一维度(1D),且第二LC称为第二维度(2D)。将含有一或多种目标分析物的样品注入具有兼容溶剂的第一LC管柱中。溶剂在高压下流动通过管柱,其中目标分析物与样品中的杂质分离。收集来自第一LC管柱的流出物且将其注入至第二LC管柱中,其中进一步解析出目标分析物。替代地,1D洗脱液可在注入至第二维度中之前滞留于捕集管柱中。含有类似于2D管柱的固定相的固定相的防护管柱可用作捕集管柱。在自第二维度洗脱之后,可进一步分析含有目标分析物的流出物。

[0065] 通常存在两种类型的2D LC。在全2D LC(LC×LC)中,将1D流出物的全料流导引至2D管柱。在中心切割2D LC(LC-LC)中,将层析图的特定流出物峰或特定部分导引至2D管柱。亦可选择层析图的多个峰或多个部分以供转移至2D管柱。LC系统中的分流阀允许切割且储存多个切口(cut),其接着在2D管柱中进行分析。

[0066] 图1说明典型的中心切割2D LC系统,其中实线指示移动相的流动方向。在步骤1中,具有正相(NP)管柱的第一LC系统将所关注脂质分析物与干扰磷脂分离。10埠分流阀将含有分析物的流出物导引至捕集管柱,其中分析物由捕集管柱滞留,而磷脂离开捕集管柱且继续至废料收集器上。在步骤2中,第二LC泵系统输入与第二LC管柱(反相或RP)相容的流体;经由控制10端口阀的位置,此流体流动通过捕集管柱,从而在捕集管柱中达成溶剂交换。在步骤3中,第二LC泵输入第二移动相溶剂,其运行通过捕集管柱且经由定位分流阀而将分析物带至RP管柱。分析物通过RP管柱进一步分离且最终通过质谱分析进行分析。

[0067] 在本公开内容的新颖2D LC系统中,仅需要一个LC泵系统。在不需要溶剂交换步骤的情况下,自第一管柱流动至第二管柱可为连续性的。此为可能的,此为因为使用一个移动相溶剂系统。尽管移动相溶剂系统的组成(例如,成分的相对比率)可在分析物行进通过分离系统时以定时方式进行调节,所以在分析物自一个管柱移动至下一个柱时,不需要进行

溶剂交换,此为因为甚至在调节其成分的情况下,溶剂系统与两个管柱兼容。视分析物自第一管柱离开的预期时间而定,两个管柱之间的分流阀可将来自第一管柱的流出物导引至废料或至第二管柱。因为不需要进行溶剂交换,两个管柱之间的分流阀可更简单,从而需要更少的埠。本公开内容的新颖2D LC系统涵盖全2D LC及中心切割2D LC系统两者。

[0068] 图3说明本公开内容的新颖2D LC系统的中心切割实施方案。在步骤1中,LC系统通过与NP管柱具有第一移动相比率的溶剂系统输入样品,其中经由定位三埠分流阀,此溶剂系统将某些所关注分析物带至RP管柱,该等所关注分析物滞留于该RP管柱中。在步骤2(亦即,稍后时间点)中,将分流阀切换至第二位置,使得将携载干扰基质的NP管柱流出物导引至废料。在步骤3中,使来自NP管柱的额外分析物行进至RP管柱,且由RP管柱滞留的所有目标分析物通过具有由LC泵系统输入的不同移动相比率的溶剂系统洗脱。使自RP管柱洗脱的目标分析物接着经受进一步分析,诸如质谱分析。由于用于整个LC运行的溶剂系统含有相同兼容组分(尽管在运行进行时呈不同比率),所以不需要中断溶剂流动以进行溶剂交换。此外,与传统2D LC系统相反,仅需要一个泵系统(展示为“LC系统1”)。

[0069] 可基于目标分析物及基质干扰组分的性质选择当前新颖系统中的1D及2D管柱。在一些实施方案中,1D管柱为正相管柱且2D管柱为反相管柱,如上所说明。在一些实施方案中(例如,对于碳水化合物分析物),1D管柱为正相管柱且2D管柱为弱阴离子交换管柱。在一些实施方案中(例如,对于蛋白质/肽分析物),1D管柱为正相管柱且2D管柱为反相管柱。在一些实施方案中(例如,对于寡核苷酸分析物,诸如循环肿瘤细胞(CTC)DNA),1D管柱为正相管柱且2D管柱为具有离子配对试剂的反相管柱。

[0070] LC溶剂可包括(但不限于)水、甲醇、乙醇、乙腈、三氟乙酸、七氟丁酸、醚、己烷、乙酸乙酯及有机溶剂,诸如烃溶剂(例如,脂族及芳族溶剂)、氧化溶剂(例如,醇、酮、醛、二醇醚、酯及二醇醚酯)及卤化溶剂(例如,氯化及溴化烃)。LC溶剂可经缓冲且可含有乙酸铵、甲酸铵、碳酸氢铵、乙酸、三氟乙酸、甲酸、三甲胺及三乙胺。在一些实施方案中,用于当前2D LC系统的溶剂系统与萃取溶剂兼容且可含有甲醇、乙腈及水。在某些实施方案中,溶剂系统含有约0-100%甲醇、约0-100%乙腈及约0-90%水,总体积百分比为100%。在特定实施方案中,2D LC系统的溶剂系统为移动相A(移动相溶剂A)及移动相B(移动相溶剂B)在各种比率下的混合物,其中移动相A含有水及0.5%三氟乙酸,且移动相B含有85%甲醇、15%乙腈及0.5%三氟乙酸。

[0071] 借助于实施例,包含一或多种脂质分析物(例如,鞘脂、胆固醇及甘油三酯)的源样品为用包含80%甲醇、15-20%乙腈及0-5%水(例如,80%甲醇、15%乙腈及5%水;或80%甲醇及20%乙腈)的萃取溶剂萃取。萃取溶剂可任选含有10mM乙酸铵及1%甲酸。接着使用包含乙腈、甲醇及水的移动相溶剂系统将萃取样品装载至LC系统,在其中脂质分析物与主要基质杂质(碳水化合物、蛋白质、核苷酸等)分离。溶剂系统可进一步包含10mM乙酸铵、1%甲酸及0.5%三氟乙酸。第一LC管柱为NP管柱,其中较低极性的脂质首先洗脱且经由分流阀导引至反相管柱,而更具极性的脂质滞留于NP管柱中。接着,将分流阀切换至废料位置以供消除携载基质杂质的NP管柱流出物。接着将分流阀切换回原始位置以将先前滞留于NP管柱中的仍更具极性的脂质分析物转移至第二维度中以供进一步解析。定时阀切换以调节溶剂流动至废料或第二管柱。在RP管柱中,更具极性的脂质分析物首先洗脱出,而较低极性的脂质分析物滞留于管柱中,直至使用更具疏水性的洗脱溶剂。接着可例如通过质谱分析进一

步分析所解析出的脂质分析物。

[0072] 亦借助于实施例,包含一或多种蛋白质/肽分析物(例如,胰岛素)的样品为用包含甲醇、乙腈及水的萃取溶剂萃取。萃取溶剂可进一步包含0.5%乙酸及0.01%三氟乙酸。接着使用包含乙腈、甲醇及水的移动相溶剂系统将萃取样品注入至第一管柱(例如,正相管柱)中,其中蛋白质/肽分析物与主要基质杂质(碳水化合物、脂质、核苷酸等)分离。溶剂系统可进一步包含0.5%乙酸及0.01%三氟乙酸。在一些实施方案中,第一维度为正相管柱,其中更具疏水性的磷脂首先洗脱出,而更具亲水性的多肽滞留于正相管柱中。在一些其他实施方案中,第一维度为阴离子交换管柱,其中带正电的多肽首先洗脱出且经由分流阀转移至第二维度,而带负电的多肽滞留于阴离子交换管柱中。接着,将分流阀切换至废料以消除基质杂质。将分流阀切换回原始位置以将先前滞留于第一维度中的多肽转移至第二维度中以供进一步解析。定时阀切换以调节溶剂流动至废料或第二管柱,且溶剂梯度设计可容易地调节以分离不同蛋白质分析物以及消除基质干扰。在另外的实施方案中,第二维度为反相管柱,其中极性蛋白质首先洗脱出,而非极性蛋白质滞留于管柱中,直至使用更具疏水性的洗脱溶剂。接着可例如通过质谱分析进一步分析所解析出的蛋白质分析物。

[0073] 亦借助于实施例,包含一或多种核酸分析物(例如,合成寡核苷酸)的样品为用包含水及乙腈的萃取溶剂萃取。接着使用包含甲醇、乙腈及水的移动相溶剂系统将萃取样品注入至二氧化硅管柱(例如,正相管柱)中,其中核酸分析物与主要基质杂质(碳水化合物、脂质、蛋白质等)分离。溶剂系统可进一步包含三甲胺或三乙胺碳酸氢盐。接着,将分流阀切换至废料以消除基质杂质。将分流阀切换回原始位置以将先前滞留于第一维度中的核酸分析物转移至第二维度中以供进一步解析。定时阀切换以调节溶剂流动至废料或第二管柱,且溶剂梯度设计可容易地调节以分离不同核酸分析物以及消除基质干扰。在另外的实施方案中,第二维度为使用离子配对机制的C18管柱,例如反相管柱。接着可例如通过质谱分析进一步分析所解析出的核酸分析物。

[0074] 亦借助于实施例,包含一或多种碳水化合物分析物(例如,N-连接的胎球蛋白寡糖)的样品为用包含甲醇、乙腈及水的萃取溶剂萃取。萃取溶剂可进一步包含10mM乙酸铵、0.5%乙酸及0.1%甲酸。接着使用包含甲醇、乙腈及水的移动相溶剂系统将萃取样品注入至二氧化硅管柱(例如,正相管柱)中,其中碳水化合物分析物与主要基质杂质(脂质、蛋白质、核酸等)分离。溶剂系统可进一步包含10mM乙酸铵、1%甲酸及0.5%三氟乙酸。接着,将分流阀切换至废料以消除基质杂质。将分流阀切换回原始位置以将先前滞留于第一维度中的碳水化合物分析物转移至第二维度中以供进一步解析。定时阀切换以调节溶剂流动至废料或第二管柱,且溶剂梯度设计可容易地调节以分离不同碳水化合物分析物以及消除基质干扰。在另外的实施方案中,第二维度为弱阴离子交换管柱。接着可例如通过质谱分析进一步分析所解析出的碳水化合物分析物。

[0075] 亦借助于实施例,包含一或多种类固醇分析物(例如,二氢睾酮)的样品为用包含甲醇、乙腈及水的萃取溶剂萃取。萃取溶剂可进一步包含10mM乙酸铵、0.5%乙酸及1%甲酸。接着使用包含甲醇、乙腈及水的移动相溶剂系统将萃取样品注入至二氧化硅管柱(例如,正相管柱)中,其中类固醇分析物与主要基质杂质(碳水化合物、脂质、蛋白质、核酸等)分离。溶剂系统可进一步包含10mM乙酸铵、0.5%乙酸及0.5%三氟乙酸。接着,将分流阀切换至废料以消除基质杂质。将分流阀切换回原始位置以将先前滞留于第一维度中的类固醇

分析物转移至第二维度中以供进一步解析。定时阀切换以调节溶剂流动至废料或第二管柱,且溶剂梯度设计可容易地调节以分离不同类固醇分析物以及消除基质干扰。在另外的实施方案中,第二维度为C18管柱,例如反相管柱。接着可例如通过质谱分析进一步分析所解析出的类固醇分析物。

[0076] 质谱分析

[0077] 由当前新颖2D LC系统分离的分析物可通过所选技术进一步分析。在多数情况下,质谱分析(MS)由于其超高敏感性而经使用。质谱仪使目标分析物离子化,基于其质荷比分离真空中的所得离子,且最终测量各离子的强度。MS极适用于定性且定量分析,此为因为质谱可指示具有给定质量的离子的浓度水平。

[0078] 质谱仪由三个主要组件组成:用于分析物电离的离子源、基于其质荷(m/z)比分离离子的质量分析器及检测所分离离子的检测器。在离子源中,2D流出物经喷雾、去溶剂化及离子化,从而产生带电粒子离子。离子在真空下迁移通过一系列质量分析器。选择具有特定(m/z)比的前驱体离子以穿过质量分析器,不包括所有其他(m/z)比的粒子。接着例如通过电子倍增器检测经分离离子。样品的电离可通过例如以下进行:电喷雾电离(ESI)、常压化学电离(ACPI)、光电离、电子冲击电离、化学电离、快速原子轰击(FAB)/液体二次离子质谱分析(LSIMS)、基质辅助的雷射解吸附电离(MALDI)、场电离、场解吸附、热喷雾/电浆喷雾电离或粒子束电离。可通过例如多反应监测(MRM)、选择性离子监测模式(SIM)、所选反应监测(SRM)或电子倍增器来检测离子。

[0079] MS数据传输至计算机,其绘制电压相对于时间的关系图。可通过将层析图中的峰下面积与校准曲线进行比较或通过比较内部标准物与测试样品的比率来测定源样品中的一或多种目标分析物的浓度。

[0080] 在本公开内容的一些实施方案中,质谱方法利用“串联质谱分析”或“MS/MS”,其中所选前驱体离子例如通过与惰性气体(诸如氩气、氦气或氮气)碰撞而进一步碎断为产物离子。第二质量分析器用于靶向特定产物离子碎片以用于检测。选择-碎断-检测次序可进一步扩展至第一代产物离子。举例而言,所选产物离子可进一步碎断以产生另一组产物离子,等等。离子的碎断型态对化合物的结构具有高度特异性且因此允许精确的结构测定。

[0081] 在一些实施方案中,质量分析器可选自四极分析器、离子阱分析器、傅里叶变换离子回旋共振(Fourier transform ion cyclotron resonance;FTICR)质量分析器、静电阱分析器、扇形磁场分析器、四极离子阱分析器及飞行时间分析器(MALDI及SELDI两者)。

[0082] 本公开内容的2D LC-MS系统进一步包含将经纯化目标分析物自2D管柱转送至质谱仪的界面。由于液相层析及质谱分析的固有不相容性,所以使用此界面。虽然LC系统中的移动相溶剂系统为经加压流体,但MS装置通常在真空下操作。界面将目标分析物自LC单元转移至MS单元,移除用于液相层析分离过程中的大部分移动相溶剂系统且保持目标分析物的化学一致性。

[0083] 在一些实施方案中,界面为电喷射界面。替代地,界面可为常压电离界面、常压化学电离界面、热喷雾界面、移动带界面、导引液体引入界面、粒子束界面或基于快速原子轰击(FAB)的界面。

[0084] 2D LC-MS将液相层析的卓越分离能力与质谱分析的卓越敏感性及选择性质量分析能力组合以提供混合物中的组分的分子质量及结构信息。此信息可经源自其他LC检测器

的信息补充,该等检测器包括(但不限于)折射率检测器、手性检测器、无线电流动检测器、UV检测器、荧光检测器、光散射检测器及导电性检测器。

[0085] 应用

[0086] 本公开内容的新颖的2D LC-MS系统(包括新颖2D LC-MS/MS系统)可用于分析(包括检测及定量)各种分子,包括小分子(例如,药物物质)及大分子(例如,生物分子)。

[0087] 在一些实施方案中,当前2D LC-MS/MS系统用于监测临床前及临床研究及开发中的生物标记物以用于筛选/诊断及治疗目的。借助于实施例,2DLC-MS/MS系统可用于测量溶酶体贮积病中某些脂质生物标记物的含量,该等病症诸如法布立病(Fabry Disease)、高歇氏病(Gaucher Disease)、克拉培病(Krabbe Disease)及酸性鞘磷脂酶缺乏症(ASMD;例如A型、B型及A/B型尼曼-匹克病(Niemann-Pick Disease;NPD))。

[0088] 如下文工作实施例中进一步说明,2D LC-MS/MS系统可用于分析来自ASMD患者的血液样品中的两种脂质生物标记物:神经酰胺(CER)及溶血性神经鞘磷脂(溶血性SPM)。ASMD为使得神经鞘磷脂聚集于整个身体的组织,特定言之脾、肝、肺、骨髓且在一些病例中,脑中的鞘脂代谢病症。溶血性SPM(神经鞘胺醇磷酸胆碱)含量升高亦常见。患者中的缺乏酶(酸性鞘磷脂酶)催化神经鞘磷脂于溶酶体中的水解碎断,从而产生磷酸胆碱及神经酰胺。由于诸如神经酰胺及溶血性SPM的脂质在ASMD患者中高度升高,所以其可用作用以筛检且诊断ASMD以及监测酶替换疗法(用重组人类ASM,诸如奥利普酶 α (olipudase alfa)进行替换)的生物标记物。

[0089] 为了更好地理解本发明,阐述以下实施例。这些实施例仅出于说明的目的,且不应视为以任何方式限制本发明的范畴。

实施例

[0090] 实施例1:人类血浆中的神经酰胺及溶血性SPM的2D LC-MS/MS检测

[0091] 此实施例描述本公开内容的新颖2D LC-MS/MS系统用以分析人类血浆样品中的神经酰胺(CER)及溶血性SPM的用途。

[0092] 化学品及试剂

[0093] 标准参考神经酰胺(来自猪脑)为购自Avanti Polar Lipids(AL,USA)。CER内部标准物(N-十九酰基-D-赤-神经鞘胺醇)及溶血性神经鞘磷脂标准物(鞘氨醇磷脂酰胆碱)为购自Matreya(PA,USA)。溶血性SPM内部标准物(d9-溶血性神经鞘磷脂)在内部合成。甲醇及乙腈(均为HPLC级别)为购自Honeywell(NC,USA)。乙酸铵为购自Sigma Aldrich(MO,USA)。去离子水为使用内部MilliQ DI系统(Millipore,MA,USA)获得。甲酸(OptimaTMLC/MS级别)为购自Fisher Scientific(Hampton,NH)。三氟乙酸(TFA)为购自EMD Millipore(MA,USA)。

[0094] 脂质萃取

[0095] 将10 μ L人类血浆与含有CER的内标物(IS)(0.22 μ g/mL)的800 μ L分析工作溶液(80%甲醇、20%乙腈、10mM乙酸铵及1%甲酸)在96孔培养盘中混合。在11,000rpm下在DVX-2500多套管涡流器(VWR Scientific Products,NJ,USA)上涡流10min且在水浴(Branson 3510超声波清洁器,Marshall Scientific,NH,USA)中音波处理10min之后,使培养盘在反向离心机(Beckman Coulter,CA,USA)中经受5min离心。将上清液转移至新96孔培养盘且提供给2DLC-MS/MS分析。基于使用线性拟合的标准曲线,将各样品中的CER浓度定量为血浆中的 μ g/mL且将溶血性SPM定量为ng/mL。

[0096] LC-MS/MS系统设定

[0097] 使用Acquity UPLC系统(Waters Corp.,Milford,MA,USA)及API 4000四极质谱仪(AB Sciex,Toronto,Canada)进行2D LC-MS/MS分析。2D LC-MS/MS系统受Analyst®软件(AB Sciex)控制。使用Microsoft Excel及Watson LIMS™软件(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)进行数据处理及分析。

[0098] 2D LC的设定为由用于第一维度的二氧化硅管柱(超二氧化硅管柱,2.1×150mm,5.0μm,Restek,PA,USA)及用于第二维度的C18管柱(Acquity UPLC BEH C18管柱,2.1×100mm,1.7μm,Waters Corp.)组成。将两个HPLC管柱置放于Acquity管柱管理器内部,使得各管柱占据管柱管理器内的不同隔室,且使两个管柱保持在相同温度(60℃)下。2D HPLC的设定包含以下连接件:

[0099] a) PEEK套管(长度为大约60cm),其将第一维度分析型管柱的出口连接至分流阀的埠1;

[0100] b) 第二PEEK套管(长度为大约70cm),其将分流阀的埠2连接至第二维度分析型管柱的入口;

[0101] c) 第三PEEK套管(长度为大约80cm),其将第二维度分析型管柱的出口连接至质谱仪;及

[0102] d) 第四PEEK套管(长度为至少60cm),其将分流阀的埠3连接至废料。

[0103] 移动相

[0104] 移动相A为水加0.5%三氟乙酸。移动相B为85%甲醇、15%乙腈及0.5%三氟乙酸。将移动相A及移动相B以不同比率混合且在运行的预定时间点处装载至LC系统,如下表1中所指示。样品的注射剂体积为2μL注射剂,且移动相流速为0.2mL/min。

[0105] 表1.2D LC溶剂条件

时间点 (min)	A%	B%
0.0	15	85
2.00	15	85
2.20	30	70
4.00	30	70
4.20	1	99
17.50	1	99
17.60	15	85
20.00	15	85

[0107] LC分流阀条件

[0108] 配合如上表所指示的溶剂系统的调节,将2D LC系统的分流阀如下文表2所指示在预定时间点处切换至不同端口位置,以允许将1D流出物的不同部分导引至废料或下一(RP)管柱。亦参见图4。

[0109] 表2.2D LC-MS/MS分流阀条件

时间点 (min)	阀位置	神经酰胺	磷脂	溶血性神经鞘磷脂
0.0 - 0.3	A (废料)	NP管柱 (洗脱)	NP管柱 (洗脱)	NP管柱 (洗脱)
0.3 - 2.5	B (RP管柱)	RP管柱 (滞留)	NP管柱 (洗脱)	NP管柱 (洗脱)
[0110] 2.5 - 3.6	A (废料)	RP管柱 (滞留)	大部分废弃 (洗脱)	NP管柱 (洗脱)
3.6 - 19.0	B (RP管柱)	自RP洗脱以进行质谱分析 (10.0 - 18.0 min)	自RP洗脱以进行质谱分析 (仅痕量)	自RP洗脱以进行质谱分析 (5 min)
19.0 - 20.0	A (废料) 再平衡	N/A	N/A	N/A

[0111] 质谱分析

[0112] 多反应监测 (MRM) 技术用于分析神经酰胺及溶血性SPM。此技术使用首先靶向对应于所关注化合物神经酰胺及溶血性SPM的离子,随后使目标离子碎断以产生一系列子代离子的三重四极MS。出于定量目的选择这些碎片子代离子中的一个(或多个)。在质谱仪内仅分离出满足此两个标准的化合物,亦即对应于化合物质量的特定亲本离子及特定子代离子。

[0113] API 4000质谱仪中的MRM通道参数展示于下表3中。

[0114] 表3. 神经酰胺MRM通道

	Q1质量 (Da)	Q3质量 (Da)	Dwell (毫秒)	ID	DP (伏特)	EP (伏特)	CE (伏特)	CXP (伏特)
[0115] 1	538.500	264.300	50.0	C16:0	60.0	10.0	37.0	10.0
2	548.700	264.400	50.0	C18:0-H2O	155.0	10.0	37.0	10.0
3	566.700	264.400	50.0	C18:0	60.0	10.0	37.0	10.0
4	594.800	264.400	50.0	C20:0	60.0	10.0	37.0	10.0
5	594.800	292.300	50.0	C20:0	60.0	10.0	37.0	10.0
6	620.000	264.500	50.0	C22:1	60.0	10.0	37.0	10.0
7	622.800	264.400	50.0	C22:0	60.0	10.0	37.0	10.0
8	630.900	264.400	50.0	C24:1-H2O	155.0	10.0	37.0	10.0
9	648.800	264.400	50.0	C24:1	60.0	10.0	37.0	10.0
10	650.800	264.400	50.0	C24:0	60.0	10.0	37.0	10.0
11	676.800	264.500	50.0	C26:1	60.0	10.0	37.0	10.0

[0116] 表4展示神经酰胺内部标准物 (IS)、溶血性SPM分析物及溶血性SPM IS的MRM通道参数。

[0117] 表4. 神经酰胺IS、溶血性SPM及溶血性SPM IS MRM通道

	Q1质量(Da)	Q3质量(Da)	时间(秒)	ID	DP (伏特)	EP (伏特)	CE (伏特)	CXP (伏特)
[0118] 1	465.100	183.900	50.0	溶血性SPM	85.0	10.5	32.0	16.0
2	474.400	193.300	50.0	D9-溶血性SPM	10.5	10.5	32.0	16.0
3	580.800	264.400	50.0	CER-IS	10.0	10.0	35.0	10.0
4	562.800	264.400	50.0	CER-IS-H2O	10.0	10.0	35.0	10.0

[0119] 结果

[0120] 在此新颖分析方法中,CER及溶血性SPM同时用与后续用于2D LC系统中的移动相

溶剂系统兼容的分析工作溶液萃取。接着将萃取样品直接注入至第一管柱中且通过连续流转移至第二管柱中而不需要进行溶剂交换。吾等发现正相层析良好适合于将CER及溶血性SPM与磷脂进行分离。因此,此方法为用作LC分离的第一维度。使用反相层析的分离的第二维度为用于将CER及溶血性SPM与结构上相关化合物(诸如糖神经鞘脂及溶血性糖神经鞘脂)进行分离。

[0121] 更特定而言,在此LC过程中,在开始时将分流阀设定在位置A处,以允许冲洗管柱。接着将阀设定在位置B处,且使在正相(NP)管柱中与磷脂分离的神经酰胺流动至RP管柱且滞留于RP管柱中。接着将分流阀切换至废料(位置A)以消除跟随在1D流出物中的磷脂及其他基质组分。最后,将分流阀再次切换至位置B,以允许溶血性SPM进入RP管柱,其中神经酰胺及溶血性SPM两者在质谱分析之前与其他潜在干扰分子分离。

[0122] 数据展示成功地萃取CER及溶血性SPM且进行定量。如图4中所展示,神经酰胺首先自NP管柱洗脱出,随后主要杂质磷脂洗脱出,且接着溶血性SPM洗脱出。通过将分流阀设定至位置A而将磷脂导引至废料,其中通过将阀设定在位置B处而将神经酰胺及溶血性SPM分析物导引至RP管柱。在RP管柱中,溶血性SPM作为单一峰出现,而神经酰胺分析物根据脂肪酸链长及双键数量分成含有以下同功异型物的不同滞留窗口:C16、C18、C20及C22:1、C22及C24:1、C24,及C26:1。资料展示,自RP管柱洗脱出的CER同功异型物作为几乎没有背景噪音的尖峰,且鉴别出各同功异型物的单一峰。进行若干次运行,且其给出一致滞留时间。

[0123] 上文2D LC-MS/MS方法将用于人类血浆中CER及溶血性SPM定量的样品周转时间自通常8天减少至仅2天。另外,包括SPE及蛋白质沉淀(PPT)程序的用于样品净化的原始劳力密集型脱机萃取工作通过利用当前萃取溶剂及连续流2D LC自25小时降至1小时。参见例如Chuang等人,Methods in Molecular Biology,第1378卷,DOI 10.1007/978-1-4939-3182-8_28。如可见于上文,整个2D LC运行在20分钟内完成。

[0124] 表5.1D LC-MS/MS与新颖2D-LC-MS/MS之间的比较

方法	每次萃取的患者样品	萃取时间/批次	LC-MS/MS运行时间/数据过程	80份样品的周转时间
[0125] 针对神经酰胺及针对溶血性SPM的PPT的原始SPE方法	80 (需要4个培养盘)	25小时 (8小时/天)	36小时	8天
针对神经酰胺及溶血性SPM的新颖2D LC-MS/MS	80 (需要1个培养盘)	1小时	32小时	2天

[0126] 实施例2:人类血浆中神经酰胺的2D LC-MS/MS检测的分析检核

[0127] 此实施例描述检核2D LC-MS/MS系统以供检测神经酰胺的研究。在此研究中,将样品、校准曲线标准物及对照添加至96孔培养盘中。接着将含有已知量的内部标准物(CER-IS)的分析工作溶液添加至该等孔。接着将培养盘涡旋、超音波处理且离心,如实施例1中所描述。在离心之后,将上清液转移至新的96孔培养盘。接着将新培养盘转移至2D LC-MS/MS系统以用于分析,亦如实施例1中所描述。

[0128] 在样品运行之后,使用Analyst™软件整合对应于个别CER同功异型物的峰。接着在Excel中对任何给定样品的个别CER同功异型物的峰面积进行求和。将总CER峰面积导入Watson®,其基于与CER-IS峰面积的总CER峰面积比率使用校准曲线截距及斜率计算总CER浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

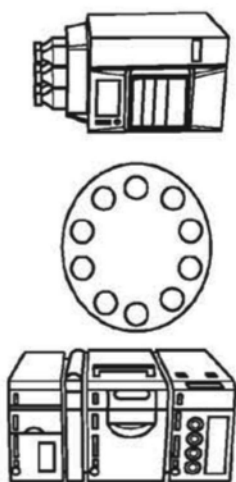
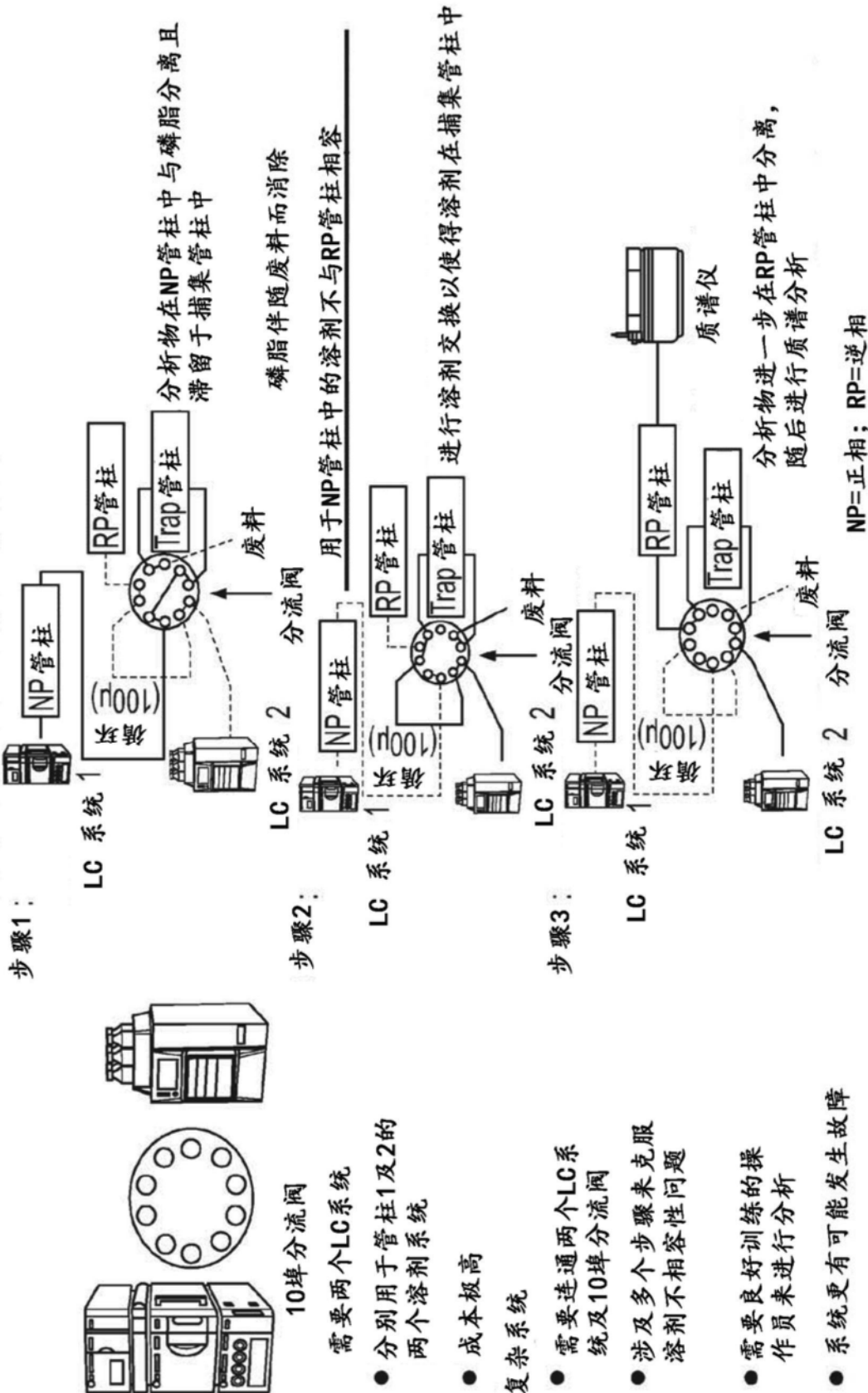
[0129] 检核新颖多任务分析以用于CER定量。检核参数包括系统适用性、运行内及运行之间的精确度及精确性、校准(标准)曲线线性、分析敏感性、残留、去脂血浆基质效应、回注可再现性、批量大小评估、萃取物回收率、样品稀释完整性、健康供体中CER参考物的测定及测定血浆CER含量的方法的比较。

[0130] 在每次运行中达到最高校正标准之后通过注射溶剂(仅分析工作溶液)来评估残留。使用三个独立批次的去脂血浆外加三种不同浓度的分析物(低质量对照或LQC、中等质量对照或MQC及高质量对照或HQC)来评估去脂血浆基质效应。通过继续再次注射在LLOQ(定量的下限)、LQC、MQC、HQC及ULOQ(定量的上限)浓度下的样品来评估回注可再现性。通过将加标前及加标后的2份合并患者样品与CER进行比较来评定萃取回收率。对于加标前及加标后的条件,在相同阶段引入内部标准物(IS)。

[0131] 数据展示,当前新颖2D LC-MS/MS方法通过多反应监测(MRM)使用这些同功异型物中的每一者的独立MS/MS通道检测到11种不同的CER同功异型物。系统适用性测试展示,在整个验证过程中进行的所有穿过运行中,CV%在0%与5%之间。所有浓度的平均偏差%及平均CV%(为数变化)通过所确定的精确度及精确性标准。将分析敏感性定义为可用可接受的精确性及精确度测量的分析物的最低浓度。LLOQ的CV%及平均偏差%分别为8%及-8%。

[0132] 分析物峰面积的最小及最大残留分别为2%及11%。在三种浓度下测量的去脂血浆基质效应的总体CV%为6%(LQC)、2%(MQC)及3%(HQC)。对于指定浓度,回注可再现性的CV%范围介于2%至4%。萃取回收率范围介于67%至88%,其中CV%自2%至11%变化。结果证实,方法为精确及准确的且经检核以用于测量人类血浆中的神经酰胺浓度。

2D LC-MS/MS的传统设定-需要两个LC系统来克服溶剂不相容性问题



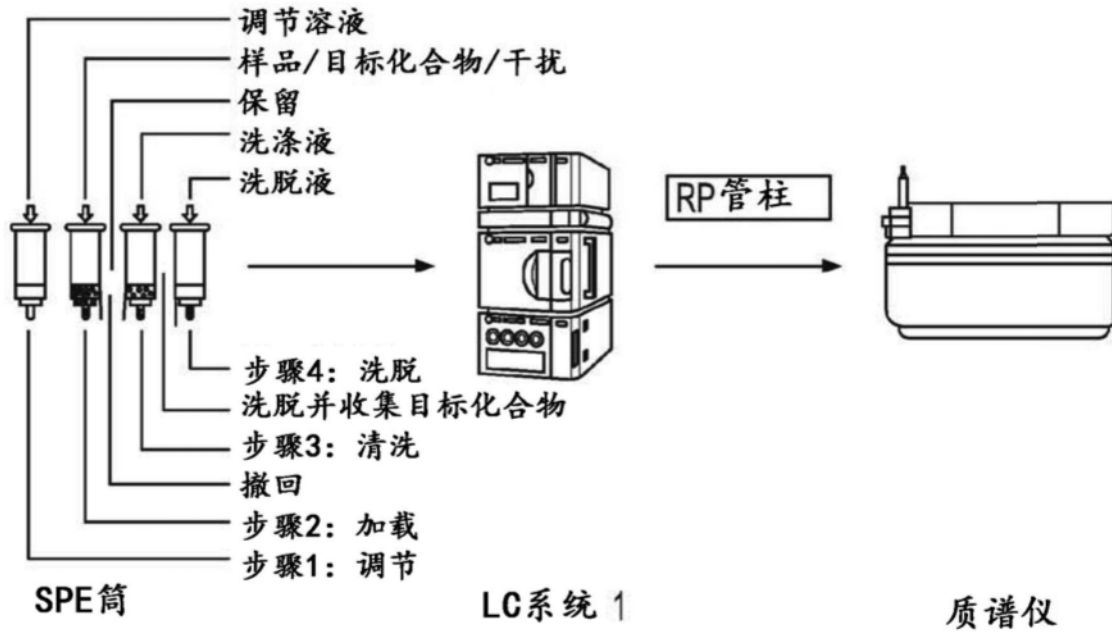
10埠分流阀

需要两个LC系统

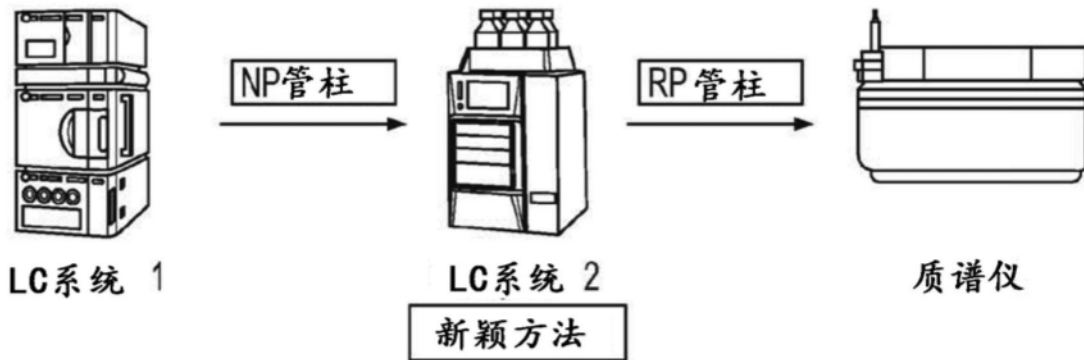
- 分别用于管柱1及2的两个溶剂系统
- 成本极高
- 复杂系统
- 需要连通两个LC系统及10埠分流阀
- 涉及多个步骤来克服溶剂不相容性问题
- 需要良好训练的操作人员来进行分析
- 系统更有可能发生故障

图1

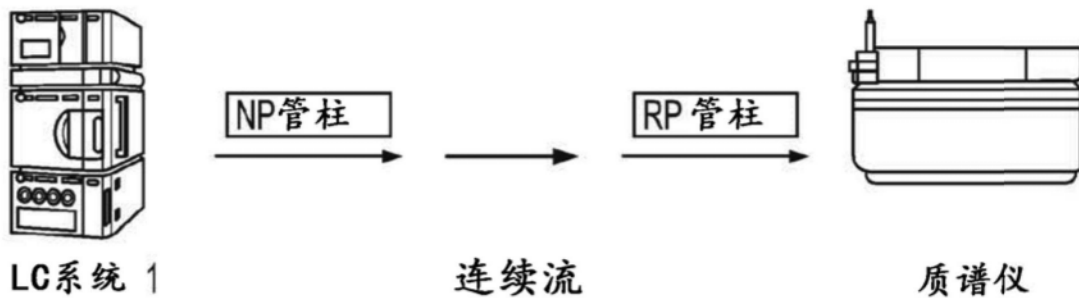
离线-SPE, 随后1D LC-MS/MS (一个LC系统)



在线-传统2D LC-MS/MS (两个LC系统)



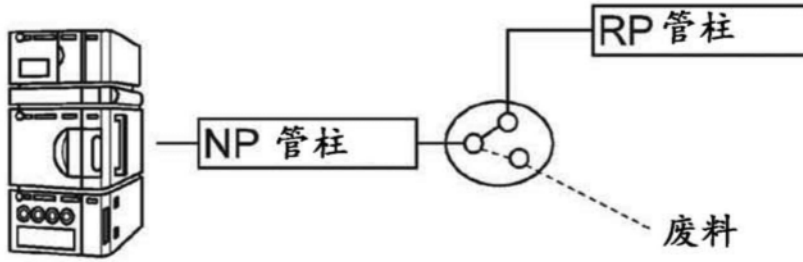
在线-连续流式2D LC-MS/MS (一个LC系统)



NP=正相; RP=逆相

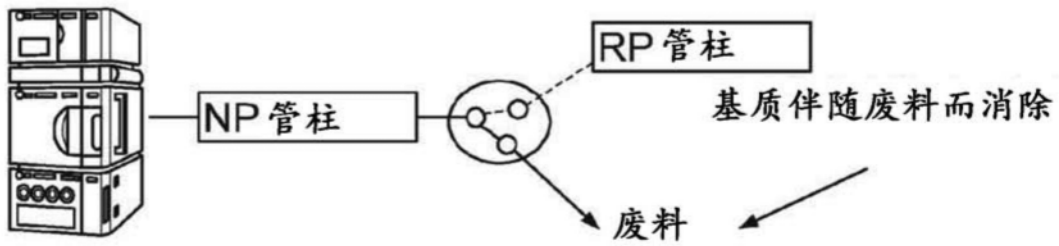
图2

步骤 1:



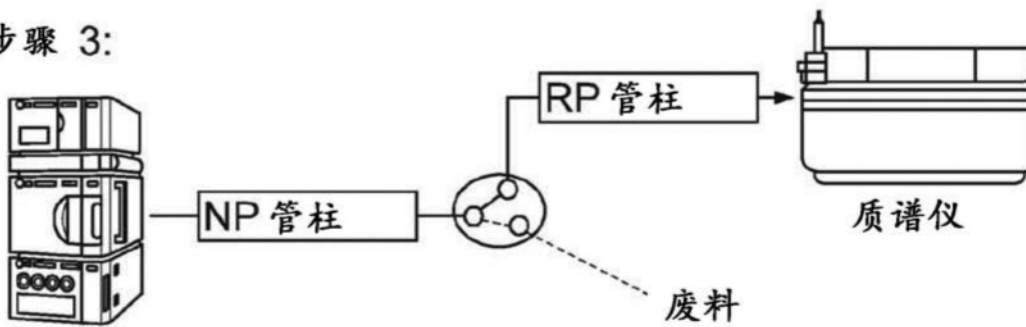
LC系统 1

步骤 2:



LC系统 1

步骤 3:



LC系统 1

NP=正相; RP=逆相

图3

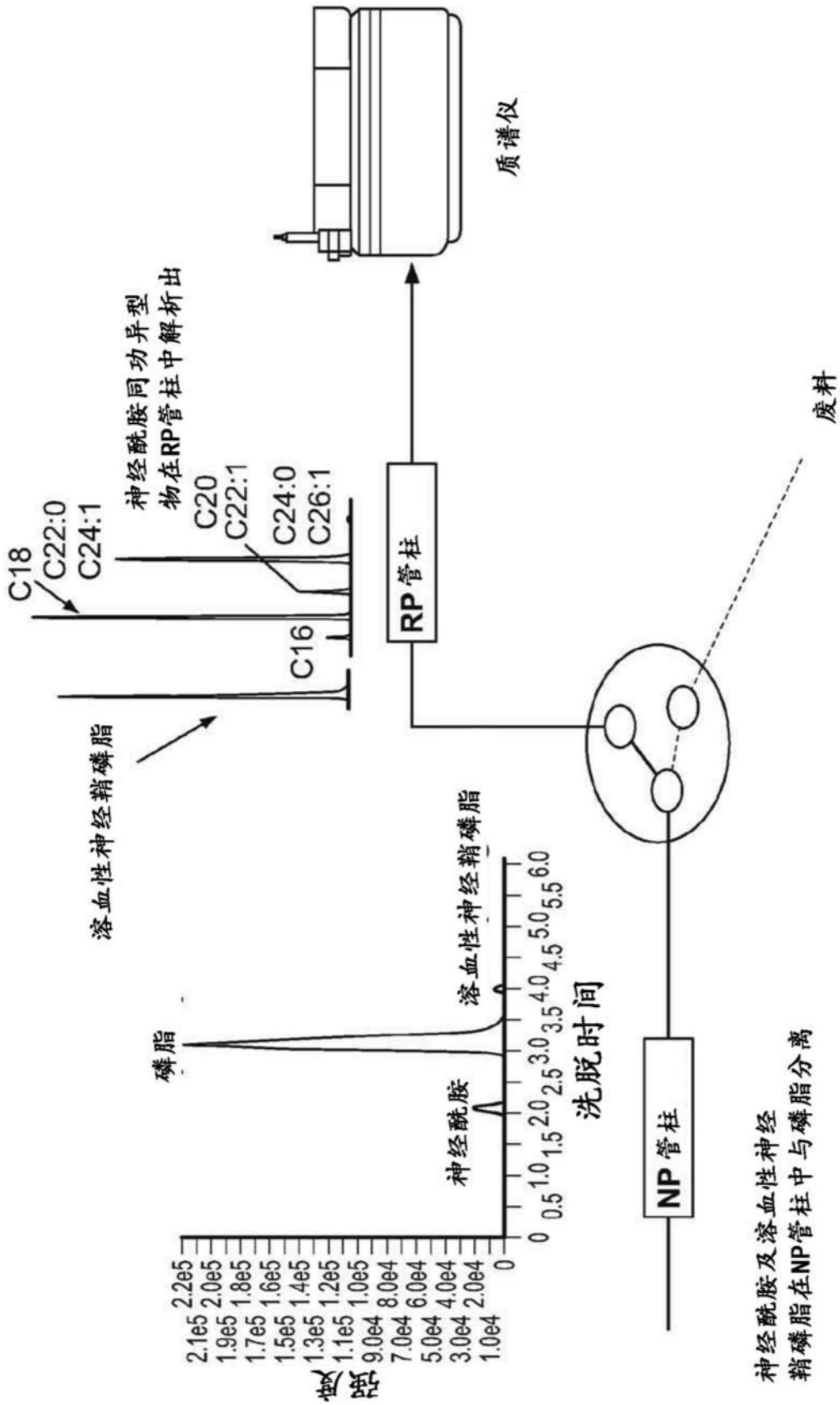


图4