

使用自动化、标准化的Oasis™ HLB SPE萃取方法对血浆中的西格列汀和哌柏西利进行生物分析

Nikunj Tanna, Mary Trudeau

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

开发和优化适合生物分析实验室使用的稳健方法对于确保分析灵敏度和重现性至关重要。固相萃取(SPE)是生物分析常用的样品萃取技术，在分离生物基质中的药物靶标时非常有用。人们通常认为SPE萃取十分复杂，由于许多步骤都需要优化，方法开发过程往往耗时很长。本应用纪要重点介绍了自动化20瓶反相SPE优化策略，该策略有助于快速、简单地开发SPE方法，从血浆中萃取分析物的回收率可达90%以上。该方法以及随后的LC-MS定量分析被成功应用于西格列汀和哌柏西利两种治疗药物的生物定量分析。

简介

生物分析是药物发现和药物开发中的重要环节。它在确定仿制药生物等效性方面也发挥着重要作用。相关实验室在开展常规分析时，必须保证分析的灵敏度、稳健性和重现性。开发和优化这些分析方法的流程也必须精简、标准化。由于通常都能提高分析的选择性、灵敏度和稳健性，SPE常被用于萃取复杂基质中的目标分析物。生物分

析的另一个要素是重现性。为了减少日间和日内差异性，也为了让科学家专注于更具挑战性的科学问题、实验设计和数据分析，越来越多的生物分析实验室开始部署自动化技术。

反相SPE是从复杂生物基质中萃取小分子的优选方法之一，用于萃取多种分析物时都能达到很高的回收率。通过微调样品预处理方法、清洗溶剂和洗脱溶剂组成，可以优化吸附剂床对目标分析物的选择性。配备Extraction+互联装置的Andrew+™移液机器人可以创建标准曲线和QC样品，还可以使用OneLab™数据库中的方法执行SPE，全程自动化，无需手动操作。本研究以西格列汀和哌柏西利两种治疗药物作为生物分析的模型分析物开展了定量分析。西格列汀通常作为单药或联合二甲双胍用于治疗2型糖尿病。哌柏西利是一种选择性CDK4和CDK6抑制剂，用于治疗HR阳性和HER2阴性乳腺癌。

实验

样品前处理

用100%甲醇（Sigma Aldrich，美国密苏里州圣路易斯）制备西格列汀和哌柏西利（Sigma Aldrich，美国密苏里州圣路易斯）储备液(1 mg/mL)。用5%甲醇水溶液连续稀释储备液，制备10 µg/mL工作储备液。用10 µg/mL工作储备液制备以大鼠血浆（BioIVT，美国纽约州韦斯特伯里）为基质的标准曲线样品和质量控制(QC)样品。标准曲线样品浓度在1~1000 ng/mL范围内，制备两个重复样；低、中和高浓度QC样品也制备两个重复样，最终浓度分别为7.5 ng/mL、75 ng/mL和750 ng/mL。从OneLab数据库下载Simple Serial Dilution（简单连续稀释）方法([Simple Serial Dilution – OneLab \(andrewalliance.com\) <https://onelab.andrewalliance.com/app/lab/GK6ovDkA/library/simple-serial-dilution-preparation-9jn2GGwa>](https://onelab.andrewalliance.com/app/lab/GK6ovDkA/library/simple-serial-dilution-preparation-9jn2GGwa)))，使用Andrew+移液机器人创建标准曲线和QC数据点。

SPE萃取

采用20瓶Oasis HLB SPE优化策略（请参阅维护和使用手册([715000109](https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=10076779&lcid=10076778&type=USRM) <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=10076779&lcid=10076778&type=USRM>>)及之前的一篇应用纪要([720008001ZH](https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=10076779&lcid=10076778&type=USRM)))快速确定最适合西格列汀和哌柏西利的SPE清洗和洗脱条件。最终SPE方案对西格列汀和哌柏西利的回收率都在90%以上，如图1所示。所有萃取步骤均采用下载自OneLab数据库的标准OneLab方法([Automated Bioanalytical SPE - OneLab \(andrewalliance.com\) <https://beta-onelab.andrewalliance.com/app/lab/Vo8el6R2/library/automated-bioanalytical-spe-8ZnN1J0A>](https://beta-onelab.andrewalliance.com/app/lab/Vo8el6R2/library/automated-bioanalytical-spe-8ZnN1J0A))，全程由Andrew+移液机器人自动执行。萃取后的样品进样至UPLC-MS/MS系统进行分析。



图1.从大鼠血浆中萃取西格列汀和哌柏西利的最终SPE方案

LC-MS分析

使用ACQUITY™ I-Class UPLC™和ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈色谱柱(100 Å 2.1 x 50 mm, 1.7 µm)对西格列汀和哌柏西利进行色谱分离，所用梯度为流动相B（0.1%甲酸的乙腈溶液）在3.5 min内从5%升至95%的通用梯度。使用Xevo™ TQ-XS质谱仪(ESI+)在多重反应监测(MRM)模式下检测每种分析物。用于西格列汀和哌柏西利定量的MRM通道分别为408.3→174.6和448.2→80.5。

结果与讨论

本研究使用配备Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人以及OneLab数据库中的现成方法制备样品，然后执行了20瓶SPE优化方案和最终的Oasis HLB SPE血浆定量实验。实验所用的标准曲线血浆样品和QC血浆样品采用下载自OneLab数据库的Simple Serial Dilution（简单连续稀释）方法轻松制备。SPE由自动化平台按照下载的Automated Bioanalytical SPE method（自动化生物分析SPE方法）执行（图2）。

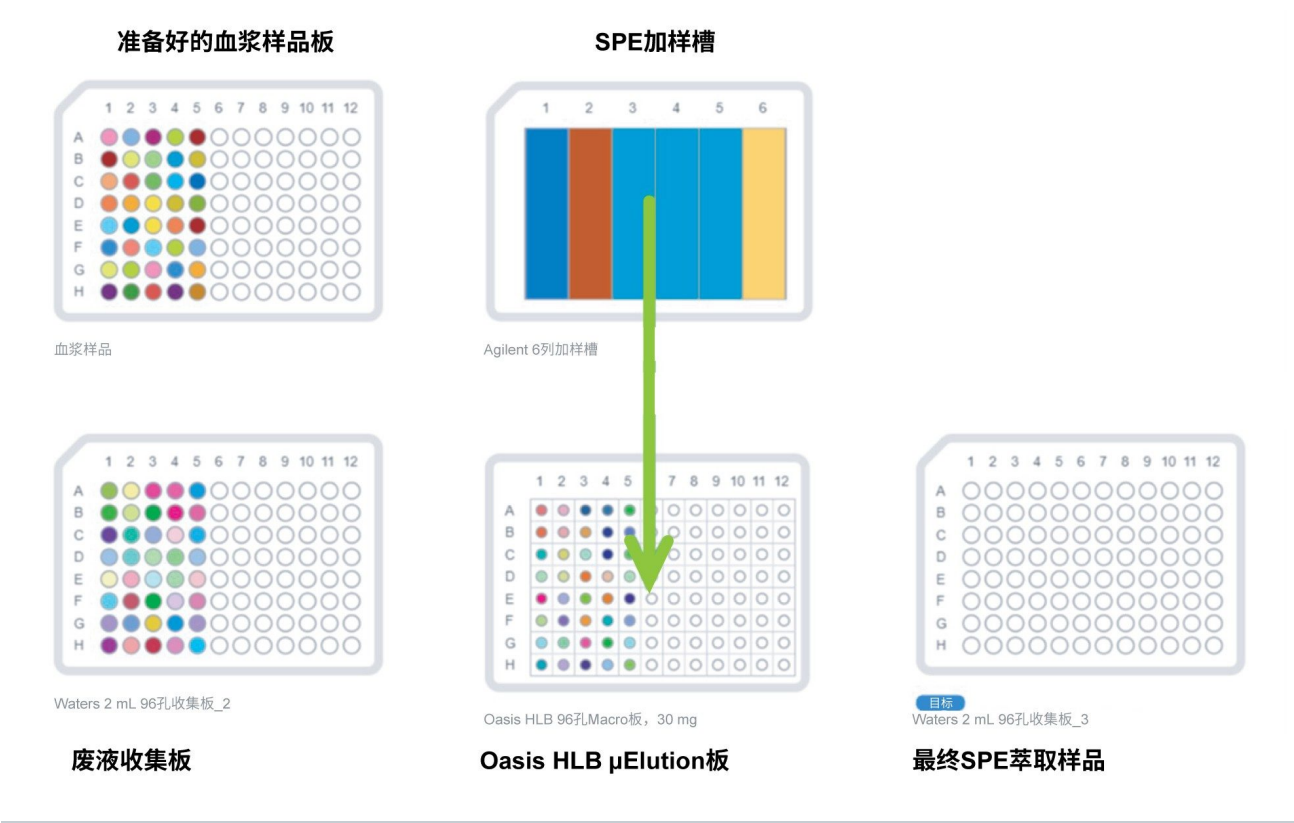


图2.从大鼠血浆中萃取西格列汀和哌柏西利的OneLab自动化生物分析SPE方法的图示

西格列汀和哌柏西利展现出优异的定量性能，通过1/x回归得到1~1000 ng/mL的线性动态范围(>0.99)，平均准确度分别为92.7%和94.5%。相关结果列于表1中。西格列汀和哌柏西利在所有QC水平的测定结果都满足生物分析方法验证标准，即准确度(%)和偏差(%)在+/-15%范围内。三个QC水平的平均准确度为90.6%~108%，平均偏差为-11.9%~9.7%（表2a和2b）。代表性QC色谱图显示，西格列汀和哌柏西利的质谱峰面积计数随分析物浓度增加而线性增加。图3a和图3b展示了这个变化。

西格列汀(1a)				哌柏西利(1b)			
标准曲线范围	线性拟合	平均准确度(%) (N=2)	平均偏差(%) (N=2)	标准曲线范围	线性拟合	平均准确度(%) (N=2)	平均偏差(%) (N=2)
1-1000 ng/mL	1/x	94.5	11.3	1-1000 ng/mL	1/x	92.7	-6.9

表1.西格列汀（表1a）和哌柏西利（表1b）的标准曲线统计数据

西格列汀(2a)					哌柏西利(2b)				
QC水平	预期浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	平均准确度(%) (N=2)	平均偏差(%) (N=2)	QC水平	预期浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	平均准确度(%) (N=2)	平均偏差(%) (N=2)
LQC	7.5	7.7	102.6	9.7	LQC	7.5	7.1	94.6	-8.6
MQC	75	71	94.6	-10.9	MQC	75	68	90.6	-11.9
HQC	750	795	106	3.8	HQC	750	810	108	4.3

表2.西格列汀（表2a）和哌柏西利（表2b）的QC统计数据

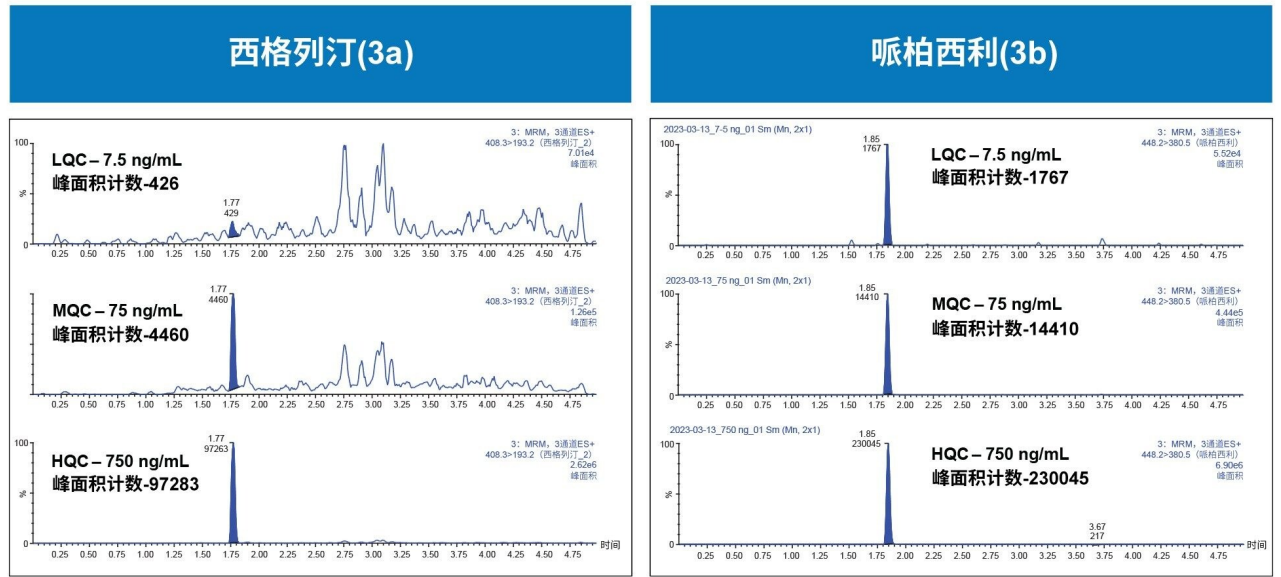


图3.从大鼠血浆中提取的西格列汀(3a)和哌柏西利(3b)的代表性QC色谱图

结论

开发和优化可供生物分析实验室使用的SPE样品萃取和LC-MS/MS方法被认为是难度相当大的一项工作，不仅方案复杂，而且方法开发耗时较长。本研究重点介绍了一种包含两个实验的全自动方案，该方案使用配备Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人快速优化血浆样品的反相Oasis HLB SPE方法，分析物回收率以及结果准确度和重现性都很出色。从大鼠血浆中萃取的西格列汀和哌柏西利展现出优异的定量性能，线性动态范围为1~1000 ng/mL，QC准确度在90.6%~108%之间，RSD在-11.9%~9.7%之间，符合小分子LC-MS方法验证指南的推荐标准。通用方案与自动化样品前处理相结合，可以大幅简化样品萃取过程，从而尽可能提高实验室效率、减少出错，确保生物分析方法的整体性能。

特色产品

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

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

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>>

720007996ZH, 2023年11月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)