

使用20瓶方案开发和优化Oasis HLB μ Elution自动化生物分析SPE方法

Nikunj Tanna, Mary Trudeau

Waters Corporation

摘要

固相萃取(SPE)是生物分析/DMPK实验室常用的样品前处理技术，该技术可以选择性地捕获分析物或药物靶标，同时去除生物基质组分，从而提高分析方法的灵敏度、选择性和稳健性。人们通常认为SPE既复杂又费力，需要花很长时间优化方法才能达到较高的分析物回收率。本文介绍了一种精巧、简单、广泛适用且完全自动化的反相SPE方法快速优化方案，该方案使用配备Extraction+的Andrew+移液机器人和Oasis™ HLB反相吸附剂（96孔板形式）大幅简化了SPE方法的优化过程。

优势

- 精巧、快速、简单的Oasis HLB SPE方法优化方案
- 分析物回收率高 (> 75%)，具有出色的重现性
- 使用Andrew+移液机器人和Extraction+自动开发SPE方法
- 从OneLab数据库一键下载即可用的优化方案，轻松完成SPE优化

简介

生物分析（或生物体液中药物及其代谢物的分析）在药物发现、开发和研究中发挥着重要作用。在优化各种基质中目标分析物的分析方法时，科学家需要关注三大方面：1-如何从基质中萃取出目标分析物，2-如何分离目标分析物与其他基质组分，3-如何检测。生物分析常用的样品前处理技术包括样品稀释、蛋白沉淀(PPT)、液液萃取(LLE)和固相萃取(SPE)。SPE是生物分析/DMPK实验室常用的一种样品前处理技术，它可以提高萃取回收率、净化样品，而且无需挥干步骤（挥干步骤可能导致样品损失）即可浓缩样品。这种技术通常有助于提高分析方法的灵敏度、选择性和稳健性。

但无论使用哪种技术，样品前处理过程都非常耗时且复杂，往往被视为分析工作流程的“瓶颈”，萃取方案的每一步都需要进行开发和优化。SPE工作流程中可以优化的关键步骤包括清洗和洗脱溶剂的选择。Oasis HLB维护和使用手册(715000109 <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf>>)提供了一套起始方案，使用该方案处理各种分析物能达到可接受的回收率。此外，本文还介绍了一套精巧的SPE实验设计方案（图1），让科学家仅通过单次实验就能优化清洗和洗脱溶液的组成，从而简化Oasis HLB方法优化过程。

对生物分析实验室而言至关重要的另一个指标是重现性。日内、日间精密度和准确度是验证方法时确保分析方法满足预期用途要求的关键指标。为了提高分析的重现性，以及节省更多时间让科学家专注于更具挑战性的科学问题，这些实验室开始越来越多地部署自动化和液体处理机器人。配备Extraction+的Andrew+移液机器人与OneLab™信息学平台组成了一套简单、灵活且易于部署的解决方案，能充分满足科学家的实验室液体处理/自动化需求。

本研究展示了20瓶方法优化方案，使用该方案，科学家仅通过单次实验即可微调SPE的2个关键步骤（清洗和洗脱）。本研究使用配备了Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人，创建了OneLab数据库方法用于执行使用Oasis HLB SPE吸附剂（96孔 μ Elution板形式）的20瓶SPE方法优化方案，如维护和使用手册中所述。科学家可从OneLab数据库下载该OneLab方法，下载后无需任何修改即可直接使用，以快速、简单又高效的自动化方式优化SPE方法。

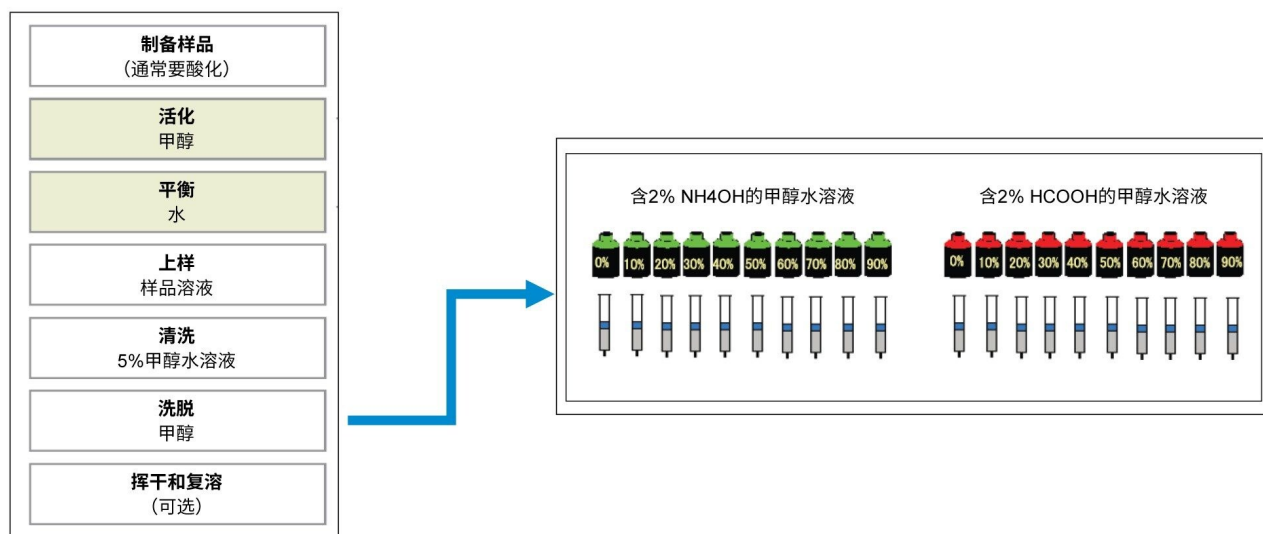


图1.维护和使用手册中Oasis HLB 20瓶方法优化方案的图示

实验

化学品、试剂、材料和溶剂：

本研究选用了一组（共6种）具有不同理化性质的小分子药物（表1）来展示Oasis HLB SPE 20瓶方法优化方案。所有分析物均购自Sigma Aldrich（美国密苏里州圣路易斯）。LC-MS级甲醇、水、乙腈、异丙醇、磷酸、氢氧化铵和甲酸也购自Sigma Aldrich（美国密苏里州圣路易斯）。K2 EDTA大鼠血浆购自BioIVT（美国纽约州韦斯特伯里）。Oasis HLB μ Elution板购自Waters Corporation（美国马萨诸塞州米尔福德）。

化合物	LogP	分子量
哌柏西利	1.8	447.5
美托洛尔	1.9	267.4
17-羟基孕酮	3.2	330.5
尼氟酸	3.7	282.2
去甲替林	4.5	263.4
阿米替林	5.0	277.4

表1.本研究使用的小分子药物分析物组

储备液、标准曲线和QC样品

准确称取约1 mg分析物并溶于适当体积的100%甲醇中，制得每种分析物的1 mg/mL储备液。用95:5% (v/v)水:甲醇以1:10的比例稀释储备液，制得100 µg/mL、10 µg/mL和1 µg/mL的工作储备液。使用Andrew+移液机器人，以最终基质加标浓度1000 ng/mL、500 ng/mL和250 ng/mL向K2 EDTA大鼠血浆中加入10 µg/mL储备液，用于绘制标准曲线(1~1000 ng/mL)。使用Andrew+移液机器人和OneLab数据库中的Simple Serial Dilution preparation（简单连续稀释）制备方案连续稀释(1:10)这些高浓度标准曲线样品。QC样品的制备方法是10 µg/mL储备液加标到大鼠血浆中，得到浓度为750 ng/mL的HQC样品。同样使用Simple Serial Dilution（简单连续稀释）方案按1:10稀释HQC样品，得到浓度分别为75 ng/mL和7.5 ng/mL的MQC和LQC样品。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY I-Class Plus UPLC（带FTN）
色谱柱：	ACQUITY Premier HSS T3, 2.1 x 50 mm（P/N: 186003538）
柱温：	60 °C

柱温：5 °C

流动相A：0.1%甲酸水溶液

流动相B：0.1%甲酸的乙腈溶液

清除溶剂：25:25:25:25
水:乙腈:甲醇:异丙醇

进样体积：2 µL

液相色谱梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.500	95	5	6
0.50	0.500	95	5	6
4.00	0.500	5	95	6
4.40	0.500	5	95	6
4.50	0.500	95	5	6
5.00	0.500	95	5	6

质谱条件

质谱系统：Xevo TQ-XS

电离模式：ESI+

采集模式：MRM

毛细管电压：	3.1 kV
脱溶剂气温度：	500 °C
脱溶剂气流速：	1000 L/h
锥孔气流速：	150 L/h
碰撞气体流速：	0.15 L/h
喷雾器：	7 Bar

数据管理

仪器控制软件：	MassLynx™ (v4.2)
定量软件：	TargetLynx™ (v4.2)

MRM通道

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
强的松	358.9	313.1	20	12
	358.9	147.1		28
美托洛尔	268.3	116.1	45	18
	268.3	98.1		18
17-羟基孕酮	331.3	109.1	30	26
	331.3	97.1		22
尼氟酸	283.3	245.4	20	32
	283.3	145.7		38
去甲替林	264.6	104.9	40	20
	264.6	233.1		14
阿米替林	278.7	90.9	40	20
	278.7	104.9		20

自动化平台

Andrew Alliance Andrew+移液机器人是一款自动化液体处理装置，由基于云的OneLab软件控制，本研究使用该装置来设计和执行样品前处理及萃取方案。

SPE萃取

使用Oasis HLB 96孔 μ Elution板（每孔2 mg吸附剂）进行反相(RP) SPE萃取。本研究使用的起始SPE方案如图2所示。简言之，即使用100 μ L 4%磷酸对100 μ L样品进行预处理。Oasis HLB μ Elution板先用200 μ L甲醇活化，然后用200 μ L水平衡。接下来，将经过酸预处理的样品上样至SPE板。用200 μ L 5%甲醇水溶液清洗SPE板。如图2所示，使用20种溶液分2步洗脱分析物，每步50 μ L。然后用100 μ L水稀释SPE样品洗脱液，进样至LC-MS系统进行分析。图3和图4分别显示了Andrew+移液机器人和Extraction+的工作台布局，以及本实验所用的OneLab方案的直观图示。

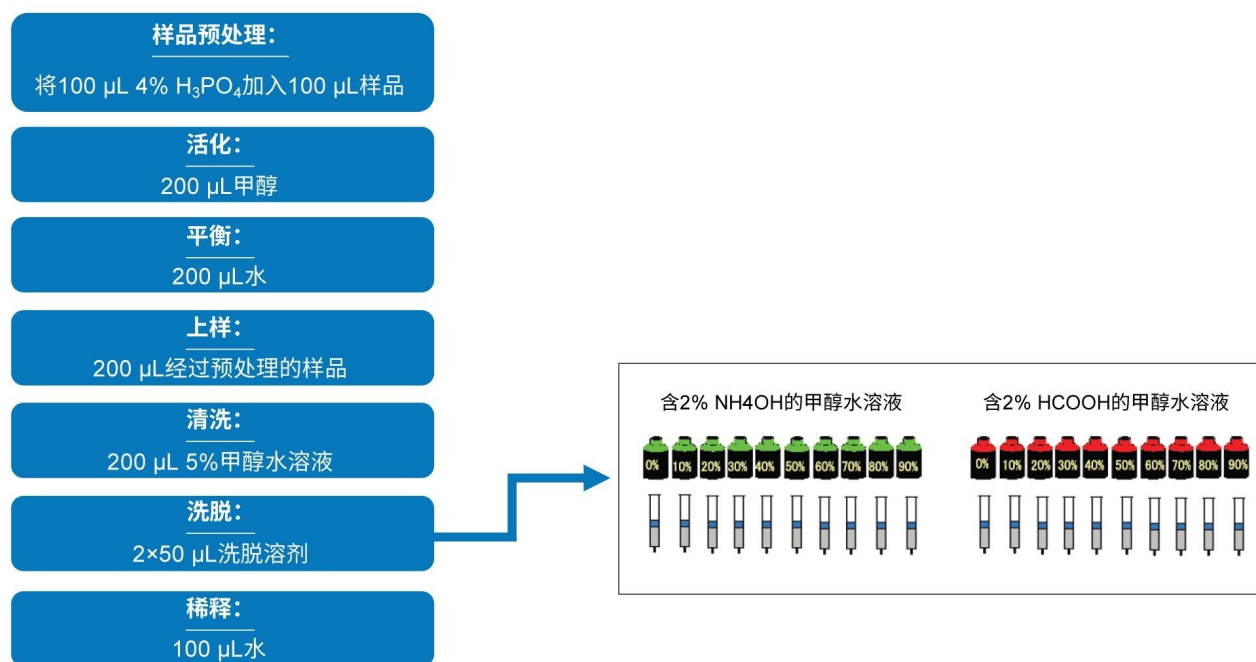


图2. 方法开发采用的Oasis HLB SPE方案



图3.Andrew+移液机器人及Extraction+的工作台布局

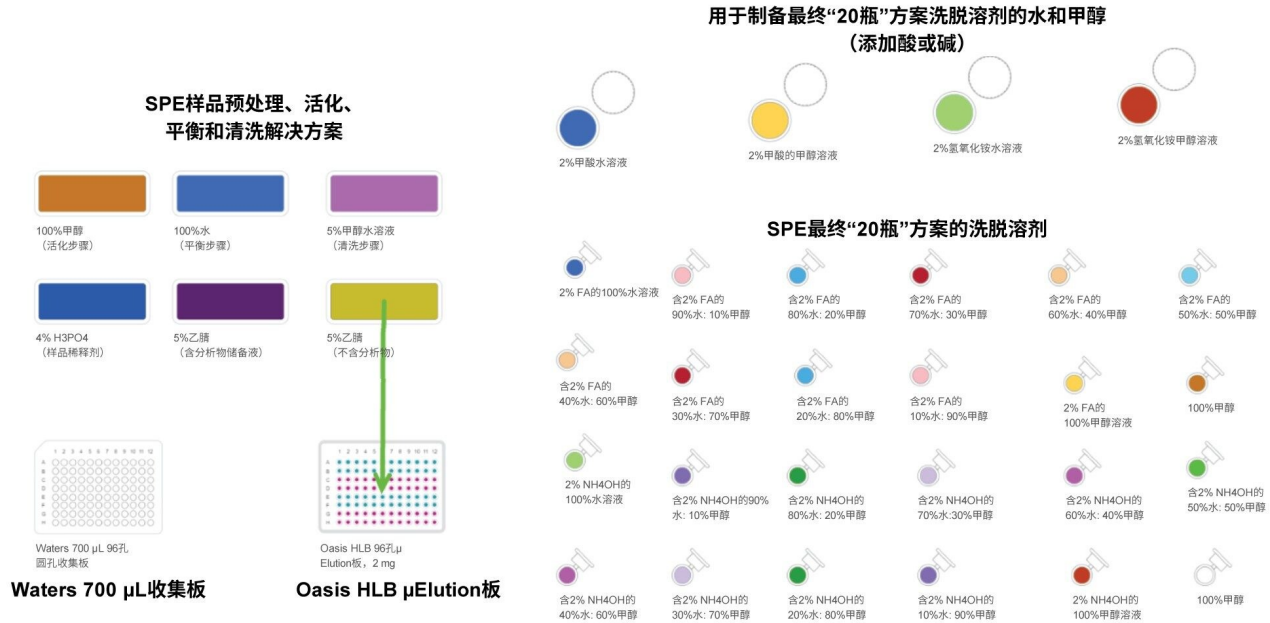


图4.OneLab方案步骤的代表性图示

结果与讨论

稳健、灵敏且可重现的分析方法是生物分析实验室的生命线。以节省时间、经济有效的方式开发和验证这些分析方法，对于确保人员和资源得到最佳利用至关重要。因此，这些实验室的科学家正努力寻找尽可能简单的方法开发方案。开发SPE方法时，通常从Oasis HLB维护和使用手册提供的通用方案开始，先使用纯溶液开展实验，了解在样品前处理方法未经任何优化的情况下可以获得的回收率(%)和灵敏度水平。对许多分析物而言，使用Oasis HLB起始方案已经可达到足够的回收率(%)和灵敏度，使分析方法达到预期目的。如果达不到所需的灵敏度水平，下一步便是按照Oasis HLB维护和使用手册中所述，使用20瓶方案来优化起始方案。

20瓶SPE方法优化方案是一个设计精巧的实验，通过改变洗脱溶液的pH和有机溶剂含量来确定最有可能从吸附剂床上洗脱目标化合物的条件。洗脱溶剂组成为0~100%有机溶剂（通常为甲醇），含2%氢氧化铵或2%甲酸。酸性或碱性洗脱溶剂有助于改变pH，而有机溶剂含量则有助于分析物从吸附剂床解离并提高溶解性。此外，由于这个实验方案可以得出分析物在不同有机溶剂浓度下的洗脱曲线，因此同样的数据还可用于确定可用作清洗溶剂的最高有机溶剂百分比，以便在保证SPE吸附剂不损失任何分析物的前提下去除不需要的基质组分，从而提高方法选择性。SPE方法开发的最终实验通常需要测试优化过的清洗和洗脱溶剂，用它们来萃取目标基质中加标的分析物，确定回收率和基质效应。

本研究选用了一组（共6种）分析物来展示20瓶方法优化方案。本研究的目的是确定能让这组分析物全都达到高回收率的理想清洗溶剂和洗脱溶剂组成。为了进一步简化Oasis HLB方法优化方案，我们在OneLab软件中创建了方法，从创建该方法要使用的20种洗脱溶剂，到使用Oasis HLB μ Elution板进行SPE处理的整个实验过程都交给Andrew+移液机器人和Extraction+自动执行。

以该组中每种分析物观察到的回收率(%)为y轴，以相应的洗脱溶剂条件为x轴作图，得到洗脱曲线。代表性洗脱曲线（去甲替林）如图5所示。橙色迹线表示使用酸性（2%甲酸）洗脱溶剂时的洗脱曲线，蓝色迹线表示使用碱性（2%氢氧化铵）洗脱溶剂时的洗脱曲线。对于去甲替林，我们观察到从70%酸性甲醇洗脱溶剂和90%碱性甲醇洗脱溶剂开始，回收率都超过了80%。上述有机溶剂浓度即为该分析物洗脱效果最佳的洗脱条件。酸性甲醇含量在50%以下或碱性甲醇含量在60%以下，都无法将去甲替林从SPE吸附剂上洗脱。理想的清洗溶剂浓度应低于上述有机溶剂浓度。

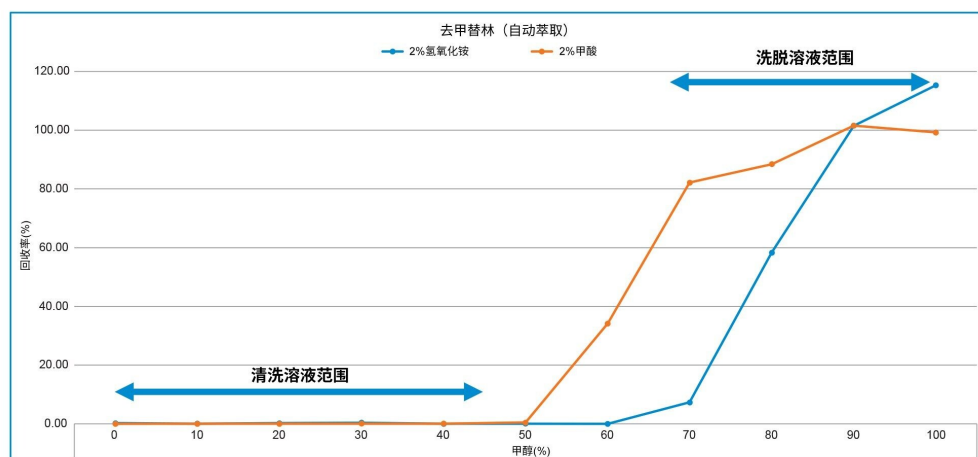


图5.代表性洗脱曲线（去甲替林）

表2a和2b展示了使用碱性和酸性洗脱溶剂时测得的组中所有分析物的回收率热图。在酸性或碱性洗脱溶剂条件下，每种分析物的回收率(%)都逐渐增加，从红色框变为绿色框。选择合适的洗脱溶剂时，就是要找到能在“目标分析物达到高回收率”与“SPE吸附剂上不会洗脱潜在不良组分”之间取得平衡的有机溶剂浓度百分比。使用含2%甲酸的80%甲醇溶液时，观察到组中的大多数分析物都达到了可接受的回收率。因此选择该溶液作为此样品组的最终洗脱溶液。类似地，理想的清洗溶液是指既能去除大部分不良基质组分，又不会洗脱任何目标分析物的最高有机溶剂浓度。根据实测数据，本研究选择了30%甲醇作为这组分析物的清洗溶剂。

(a) 2%氢氧化铵						
洗脱溶剂 甲醇百分比	阿米替林	尼氟酸	17-羟基孕酮	强的松	去甲替林	美托洛尔
0%	0.22	0.01	0.65	0.29	0.06	0.06
10%	0.06	0.02	0.06	0.05	0.09	0.09
20%	0.22	0.02	0.18	0.16	0.15	0.07
30%	0.38	0.07	0.07	0.28	0.30	0.01
40%	0.05	0.98	0.10	0.80	0.12	0.56
50%	0.08	31.46	0.43	16.09	0.01	5.03
60%	0.01	82.87	4.15	57.79	0.16	37.14
70%	7.32	85.74	26.04	87.16	9.30	79.98
80%	58.32	93.17	68.48	88.64	41.81	88.69
90%	101.51	98.07	81.45	100.49	92.62	97.58
100%	115.29	94.69	93.22	95.62	98.12	90.12

(b) 2%甲酸						
洗脱溶剂 甲醇百分比	阿米替林	尼氟酸	17-羟基孕酮	强的松	去甲替林	美托洛尔
0%	0.02	0.00	0.07	0.03	0.05	0.21
10%	0.04	0.00	0.08	0.08	0.06	0.31
20%	0.03	0.00	0.02	0.11	0.06	0.40
30%	0.06	0.00	0.05	0.11	0.06	5.73
40%	0.05	0.00	0.01	0.11	0.06	29.62
50%	0.44	0.01	0.04	0.17	0.28	39.17
60%	34.15	0.02	0.05	11.25	19.34	56.49
70%	82.15	0.10	2.37	57.88	57.81	58.52
80%	88.43	76.53	73.17	76.25	107.44	68.13
90%	101.54	47.70	73.62	73.40	87.56	95.84
100%	99.22	51.24	78.34	86.38	92.88	83.22

表2.组中所有分析物的洗脱曲线热图

在后续实验中，我们采用第1次实验确定的清洗和洗脱条件，对以1 µg/mL加标到大鼠血浆中的分析物组进行SPE处理，比较了采用最终清洗/洗脱溶剂条件萃取纯溶液（5%甲醇）和大鼠血浆中加标分析物的回收率。由图6可见，采用经过优化的最终清洗和洗脱条件时，所有分析物的回收率都不相上下(>80%)。本研究还计算了组中每种分析物的基质效应。如图7所示，在最终SPE条件下，除阿米替林外，其他所有分析物的基质效应都低于15%。通过选择不同的清洗/洗脱条件、评估不同的MRM通道，或是在SPE之前进行酸/碱预处理，可以进一步优化阿米替林的基质效应（但这并不是必需步骤）。

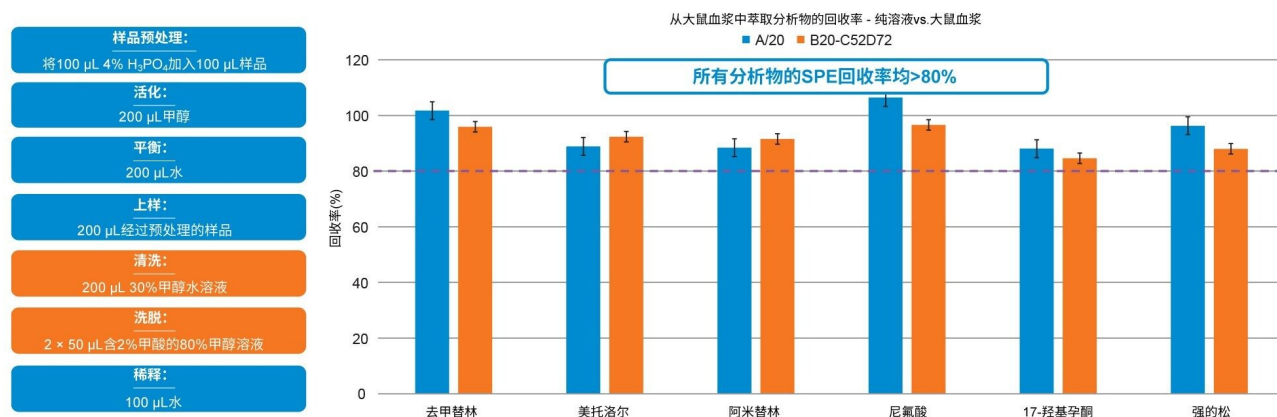


图6.基于优化结果确定的最终SPE方案。

图中比较了采用经过优化的最终SPE方案处理加标到纯溶液（5%甲醇）和大鼠血浆中的分析物组的回收率(%)。

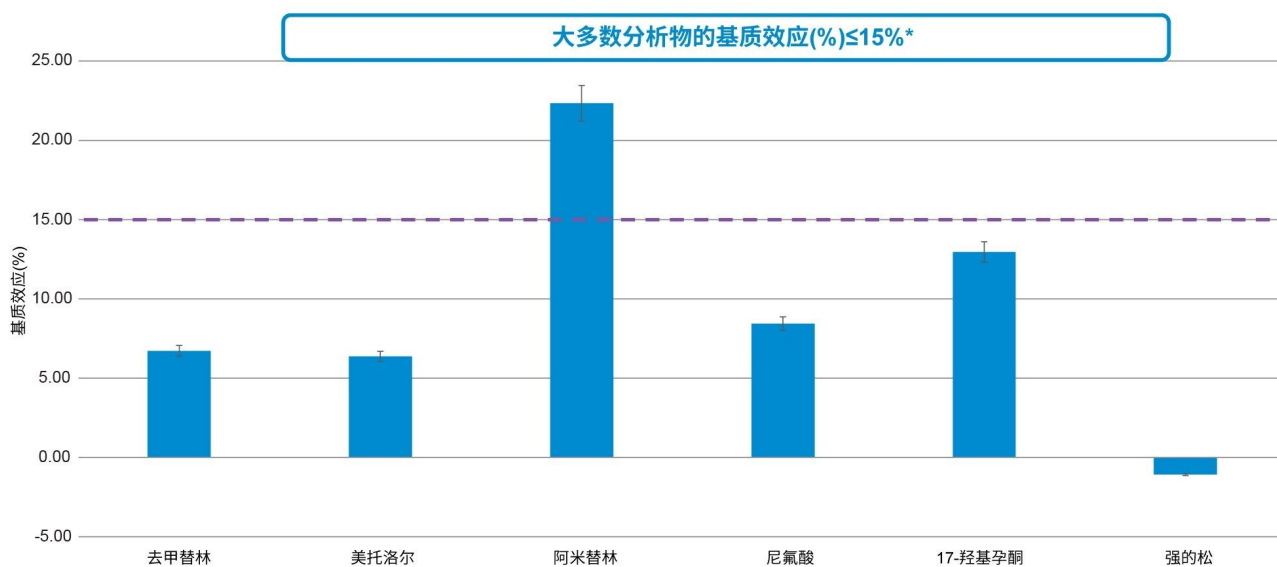


图7.在大鼠血浆中加标分析物组并使用最终SPE方案萃取后测得的基质效应(%)

我们对代表典型生物分析批次的样品组应用了经过优化的最终SPE方案，即清洗步骤使用30%甲醇溶液，洗脱步骤使用含2%甲酸的80%甲醇溶液。本次分析将去甲替林作为模型分析物。

使用Andrew+移液机器人执行OneLab中的Simple Serial Dilution（简单连续稀释）方法，向K2 EDTA大鼠血浆中加标去甲替林。使用10 µg/mL储备液制备标准曲线重复样(1~1000 ng/mL)和QC点重复样（7.5 ng/mL、75 ng/mL和750 ng/mL）。从OneLab数据库下载Bioanalytical SPE method（生物分析SPE方法），用于萃取大鼠血浆中的去甲替林。萃取采用的最终SPE方案如图6所示。采用“实验”部分所述的LC-MS方法分析萃取后的样品。

实验测得的去甲替林标准曲线统计数据 and QC统计数据(N=2)见表3。去甲替林在1~1000 ng/mL范围内呈线性（线性1/x加权），r²为0.9943。去甲替林标准曲线的平均准确度(%)为104.8%，平均偏差为-8.73%。去甲替林在所有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。各QC水平的平均准确度在96%~110%范围内，平均偏差(%)在-11.9%~5.4%范围内。代表性QC色谱图（去甲替林）显示，质谱峰面积计数随分析物浓度增加而线性增加（图8）。

去甲替林				
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	104.8	-8.7	

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	7.2	96	-11.9
MQC	75	81	108	5.4
HQC	750	825	110	4.1

表3.使用经过优化的最终SPE方案萃取大鼠血浆中的去甲替林得到的标准曲线统计数据(3a)和QC统计数据(3b)

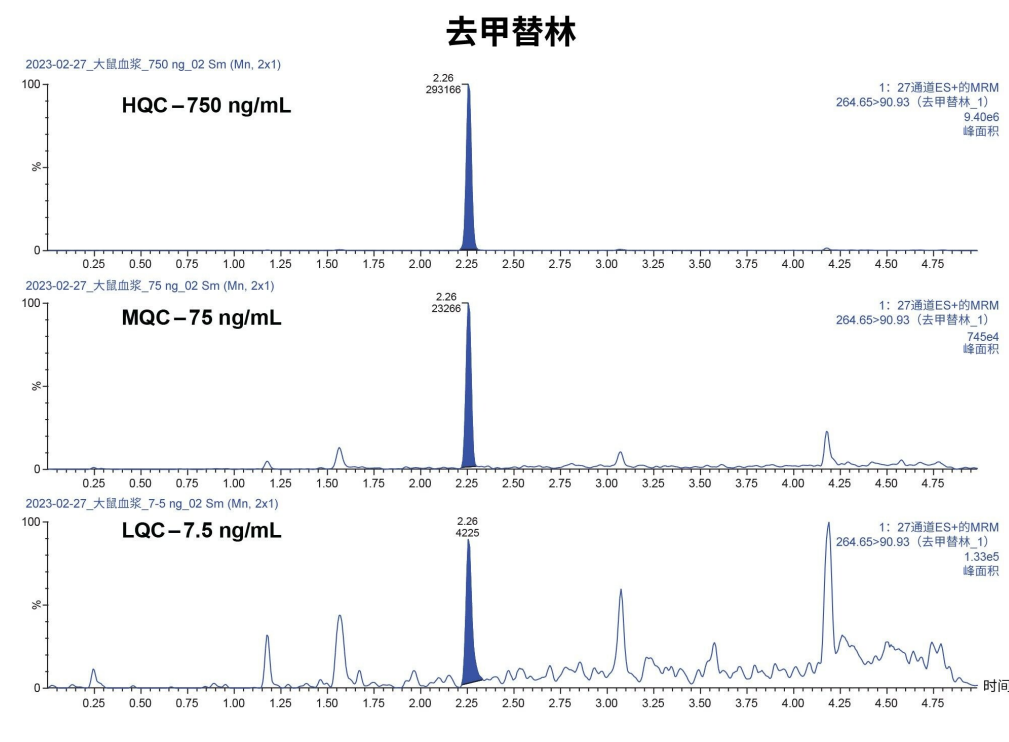


图8.代表性QC色谱图（去甲替林），由图可见质谱峰面积计数随分析物浓度增加而增加

。

结论

本研究应用20瓶方法优化方案优化了一种分析方法，该方法使用Andrew+移液机器人和Extraction+互联装置分析6种物质组成的分析物组。根据所得结果，最适合这组分析物的样品清洗溶剂和洗脱溶剂分别是30%甲醇和含有2%甲酸的80%甲醇溶液。我们在代表性的生物分析实验中使用经过优化的条件定量了大鼠血浆中的去甲替林。从大鼠血浆中萃取的去甲替林在1~1000 ng/mL范围内呈线性。所有标准曲线和QC点均符合生物分析方法验证指南的要求(+/-15%)。

当需要高选择性、高回收率和低基质效应时，固相萃取(SPE)是生物分析/DMPK实验室的优选方法。然而，开发SPE方法的难度很大，需要优化多个步骤。本文重点介绍了简单、精巧的20瓶方法优化方案，使用该方案可以优化反相Oasis HLB μ Elution分析方法。本实验优化了清洗和洗脱溶液。用户可以一键下载和使用由Andrew+移液机器人和Extraction+互联装置执行的OneLab方法，使得方法开发过程更简单、更轻松，不仅节省时间，还能保

证不同经验水平用户间的一致性。

参考资料

1. Oasis HLB Cartridges and 96-Well Plates, Waters Care and Use Manual, [715000109](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf) <
<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf>> .

特色产品

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

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>>

<https://www.andrewalliance.com/>

Andrew+移液机器人 >

720008001ZH, 2023年10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](#)