

用于生物分析方法开发的肽SPE自动化

Suma Veeramachineni, Mark Wrona

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

生物分析需要仔细的方法开发，从而确定适当的工作参数以实现稳定可靠的样品制备和化合物提取。用户可以使用Andrew+™移液机器人开发自动化SPE样品制备方法，从而专注于更复杂的任务。



图1. Andrew+移液机器人工作台布局。

优势

- 使用Oasis™肽方法开发96孔μElution提取板，并通过Andrew+移液机器人的自动化简化了混合模式SPE吸附剂选择过程，从而实现快速、可靠且可重现的分析物回收方法。与Waters™ Xevo™三重四极杆质谱仪和Waters™ ACQUITY™ Premier UPLC™系统集成，为定量肽提供了稳定的端到端解决方案
- 用于SPE工作流程的一套易于应用的OneLab™方案，采用了μElution提取板形式，可获得较高的样品通量
- Andrew+移液机器人采用了实验室环境中常用的实验室器皿，便于设置和执行

简介

为了去除可能对目标分析物定量产生不利影响的基质成分，生物样品的LC-MS/MS分析需要执行大量的样品净化步骤。基于肽和蛋白质的治疗药物都面临着特定的方法开发挑战，其开发过程可能十分耗时以及繁琐。

本研究展示了一种自动化固相萃取(SPE)方案，使用Oasis肽方法开发96孔μElution提取板开发一种可重现且稳定的血浆样品多肽提取方法。96孔板形式包含六行，每行包含两种Oasis混合模式离子交换填料：混合模式阴离子交换剂(MAX)，非常适合 $pK_a > 2-8$ 的肽；弱阳离子交换剂(WCX)，通常是 $pK_a > 10$ 的肽的理想之选。只需要一套SPE方案即可快速轻松地实现样品制备方法的开发。

结果与讨论

SPE吸附剂选择方法开发中的所有步骤均由Andrew+移液机器人按照OneLab软件中的设定自动化执行，包括样品稀释、上样、平衡、清洗、洗脱、参比样品后加标以及控制SPE萃取装置的真空度。在本例中，采用LC-MS/MS对SPE提取样品定量。使用Andrew+移液机器人自动化SPE吸附剂选择方案，使整个过程更加快速、可重现、稳定，且只需极少的手动干预。另外，得益于该方法的自动化，用户可以通过合乎逻辑且可再现的方式测试多个变量（例如，清洗和洗脱溶剂的不同组分搭配或不同真空装置，以获得更好的回收率）。图2显示了从血浆样品中固相萃取肽类的PST-SPE工作流程。

SPE试剂

预处理:	4% (体积比) 磷酸水溶液。
清洗1:	5% (体积比) 氢氧化铵水溶液。
清洗2:	20% (体积比) 乙腈水溶液。
洗脱:	含1%三氟乙酸的乙腈/水(75/25)溶液 (体积比) 。

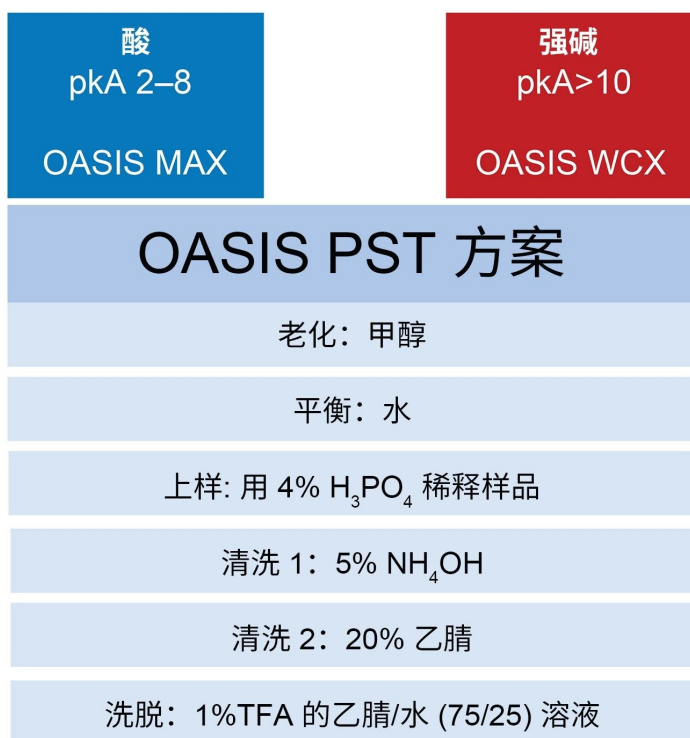


图2.应用Oasis肽分离技术的SPE方案。

名称	序列	分子量	pI	使用的 MRM 通道	
				母离子 (m/z)	子离子 (m/z)
戈舍瑞林	XHWSYXLRP	1269.4	8.75	635.7	249.3
亮丙瑞林	XHWSYLLRP	1209.4	8.75	605.7	299.4
比伐卢定	FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL	2180.3	3.91	1091.1	1531.6
普兰林肽	KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSNTY	3949.0	8.90	988.4	968.1

表1.本研究中使用的肽。

在本方案中，通过从加标的人血浆样品中提取四种分析物（亮丙瑞林、戈舍瑞林、普兰林肽和比伐卢定），展示了利用Oasis肽方法开发96孔 μ Elution提取板实现的吸附剂选择方法自动化。通常情况下，两种Oasis混合模式吸附剂填料WCX和MAX中的一种能使肽类产生良好的分析物回收率，具体取决于肽的特性。在本例中，平均Pi >8.00的亮丙瑞林、戈舍瑞林和普兰林肽在使用WCX吸附剂时表现出良好的回收率，而平均Pi为3.91的比伐卢定则在使用MAX吸附剂时表现出更好的回收率，如图3所示。

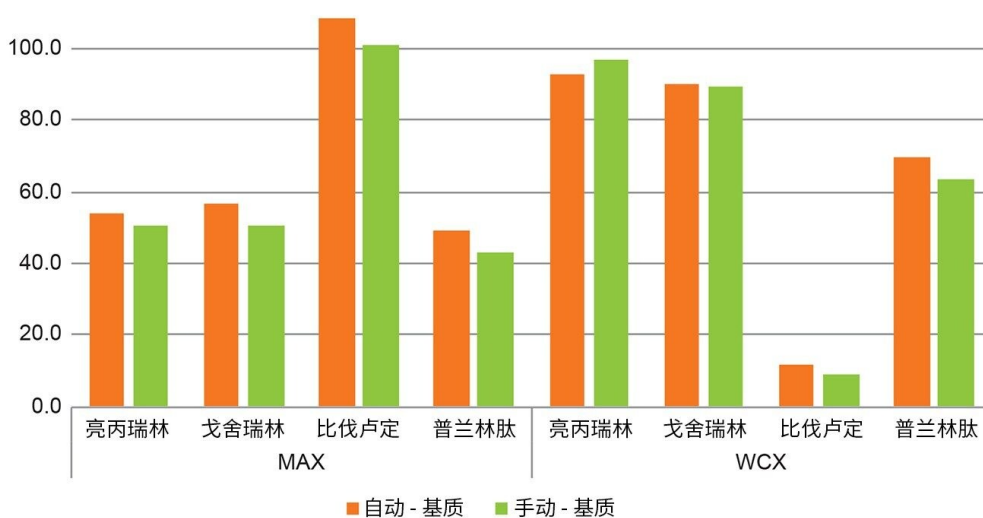


图3.使用MAX和WCX吸附剂进行手动与自动化处理的肽回收率对比。

为证明从手动处理到自动化的方法转移的重现性和稳定性，本研究使用Andrew+移液机器人分别进行了手动和自动操作。表2中所示的手动样品处理与自动化处理的结果对比表明，此方案可以轻松可靠地交由Andrew+移液机器

人执行。重复进样(n=4)之间的%RSD很小(<5%)，表明Andrew+移液机器人具有较高的移液精密度。手动处理和自动化之间的差异小于10%（最大5.4%），进一步印证了将方法转移到机器人上的可信度。

		Andrew+		手动方法		Andrew+ vs 手动方法
吸附剂	肽	准确度 (%)	%RSD (n=4)	准确度 (%)	%RSD (n=4)	% 差异
MAX	比伐卢定	106.8	1.5	101.4	5.1	5.4
WCX	亮丙瑞林	92.8	4.8	96.7	4.5	3.9
	戈舍瑞林	89.9	1.5	89.5	6.0	0.3
	普兰林肽	69.4	2.0	66.8	2.7	2.6

表2.使用PST-SPE方案对肽进行自动化与手动样品处理的结果对比。

自动控制真空的Microplate vacuum+萃取装置与IKA VACSTAR泵相连，能通过OneLab软件提供逐步增加且受控制的压力（压力梯度）。此功能对于肽的SPE特别有用，这是因为准确控制吸附和洗脱的速率/时间能够有效提高SPE的回收率。我们进行了一项实验来证明这一点，此实验在上样和洗脱步骤期间使用了单一设置的真空（在700 mBar的负压下持续60 s），而没有采用逐步增加的压力梯度（例如，分别在950 mbar、800 mbar和700 mbar的负压下持续20、30和10 s）。完整的方案可在OneLab方案库中的“[Peptide SPE Method Development < https://onelab.andrewalliance.com/library/peptide-spe-method-development-pVnV50DW>](https://onelab.andrewalliance.com/library/peptide-spe-method-development-pVnV50DW)”（肽SPE方法开发）标题下找到。表3中显示的结果表明，与自动控制的梯度压力相比，单一设置（非梯度）的压力的回收率更低，数据差异性更高。

		梯度真空		无梯度真空	
吸附剂	肽	准确度 (%)	%RSD (n=4)	准确度 (%)	%RSD (n=4)
MAX	比伐卢定	106.8	1.5	68.7	35.0
WCX	亮丙瑞林	92.8	4.8	63.1	13.1
	戈舍瑞林	89.9	1.5	56.4	6.1
	普兰林肽	69.4	2.0	48.0	15.9

表3.PST-SPE方案的梯度与无梯度真空控制的对比。

结论

本研究工作证明了Andrew+移液机器人能够轻松自动化和执行肽治疗药物的SPE方法。

- 使用适当的SPE吸附剂能对所有肽实现出色的回收率
- 重复进样(n=4)之间的%RSD很小(<5%)，表明具有较高的移液精密度
- 手动处理和自动化之间的差异小于10%（最大5.4%），进一步印证了将方法转移到Andrew+系统上的可信度
- 自动控制真空可实现更好的方法控制，从而提高回收率并减少重复进样之间的差异性
- OneLab是一款用户友好的软件，对专业知识要求不高，用户可以借助此软件轻松编写脚本以及执行实验室方案。用户可通过该款合规软件与世界各地的其他实验室成员甚至其他实验室的合作者安全地共享方案
- 借助Andrew+移液机器人以及OneLab软件中新开发的肽SPE方法开发脚本，可以简单地在用户和实验室之间进行方法转移

参考资料

1. Oasis肽生物分析参考卡.沃特世文献 720006298ZH <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006298en.pdf>> , 2018.
2. OneLab protocol: Peptide SPE Method Development <<https://onelab.andrewalliance.com/library/peptide-spe-method-development-pVnV50DW>> .
3. Dunning CM, Lame M, Wrona MD, Haynes K. 利用具有MaxPeak高性能表面的QuanRecovery样品板开发一种对血清中普兰林肽进行生物定量分析的SPE LC-MS/MS方法. 沃特世应用纪要 720006527ZH, 2019.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

<ht

<ht [tps://www.andrewalliance.com/pipetting-](https://www.andrewalliance.com/pipetting-robot/)

[robot/](https://www.andrewalliance.com/laboratory-robot/software/)

Andrew+移液机器人 >
software/

OneLab软件 >

720007591ZH, 2022年4月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

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