

一种简单、广泛适用的自动化生物分析样品前处理策略用于阿哌沙班的LC-MS定量分析：常用生物分析萃取技术的评估

Jonathan P. Danaceau, Mary E Trudeau

Waters Corporation

摘要

本研究展示了一种简单、通用、广泛适用的全自动样品前处理策略，无需开发方法，适用于多种常见的生物分析萃取技术，包括蛋白沉淀(PPT)、支撑液萃取(SLE)和固相萃取(SPE)。所有样品前处理和萃取工作均在Andrew+移液机器人上使用通用的萃取方案进行，用于后续的LC-MS/MS检测和血浆中治疗药物阿哌沙班的定量分析。

优势

- 简化的生物分析样品前处理策略，无需开发方法即可通过PPT、LLE、SLE和SPE从生物基质中成功萃取分析物
- 通用的萃取方法方案，从萃取的血浆中获得的分析物回收率高，结果可重现
- 自动化样品萃取，可执行“无人值守”方法，减少人为错误的风险，提高分析性能并节省科学家的时间
- 优异的定量性能，线性动态范围为2~500 ng/mL，从血浆中萃取阿哌沙班的QC准确度 $\geq 90\%$ ，RSD $\leq 10\%$

简介

一种简单、广泛适用的自动化生物分析样品前处理策略用于阿哌沙班的LC-MS定量分析：常用生物分析萃取技术的评估

生物分析方法对于支持新型候选药物的发现和开发至关重要。常用的样品前处理方法可以从简单的技术（如“稀释-上样”或蛋白沉淀(PPT)），到靶向性更强的专用方法（如液液萃取(LLE)、固相萃取(SPE)或免疫亲和纯化）。无论采用哪种萃取技术，样品前处理和生物基质中的药物萃取都常常是生物分析工作流程中的瓶颈，这一过程由于必须评估的萃取技术种类繁多，还涉及到与这些技术相关的繁琐且费时的多步骤方案，因此也是最复杂且方法开发阶段耗时最长的部分。一般来说，简单的技术适用性更广，方法开发也更轻松，但需要在洁净度和灵敏度方面做出一定的妥协。特异性更高的技术可提供更出色的洁净度、特异性和灵敏度，但适用性更有限，并且可能需要进行更多方法优化。样品前处理方法的选择通常取决于应用、生物基质和方法的分析要求。对于一般筛查或定性工作，样品稀释或蛋白沉淀(PPT)等简单方法可能比较合适，而高灵敏度的定量确认通常需要更专业的方法。图1突出显示了这一趋势，展示了不同样品前处理技术不断提高的复杂性和特异性。

无论使用何种样品前处理技术，都必须符合预期目标，达到所需的灵敏度、稳定性和通量。对于生物分析中的液相色谱质谱联用(LC-MS)方法，需要评估的两个关键属性是分析物回收率和基质效应。回收率简单来讲就是萃取效率，而基质效应可以量化特定方法中特定分析物的离子抑制程度，通常用作萃取洁净度的衡量指标。此外，监测残留的磷脂或其残留程度也可用作样品洁净度的一个衡量指标。磷脂(PL)是造成生物样品中离子抑制的最常见因素之一，尽可能减少此类物质有助于提高样品前处理技术的洁净度和可靠性。

本研究评价了几种常用的生物分析技术，包括PPT、去除PL的PPT、支撑液液萃取(SLE)、反相(RP) SPE、去除PL的RP-SPE和混合模式SPE，用于从血浆中萃取治疗性药物阿哌沙班。所有萃取技术均使用制造商推荐的通用方案进行评估。所有样品前处理和萃取均使用配备Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人执行，并通过直观的基于云的OneLab软件进行控制。自动化样品方案易于执行，改编自现有的OneLab数据库方法。两种方法的效率和洁净度通过分析物回收率、基质效应和残留PL来比较。研究中还评估了每种萃取技术的阿哌沙班定量性能（例如，线性、准确度和精密度）。结果表明，随着样品前处理特异性的提高，回收率普遍上升且基质效应普遍降低，这与我们在以往的工作中观察到的趋势一致（720005495、720006516）^{1,2}。

实验

材料

阿哌沙班购自Cerilliant(www.cerilliant.com <<http://www.cerilliant.com>>)。用作内标(IS)的¹³C-d3阿哌沙班购自Cayman Chemicals (www.caymanchem.com <<http://www.caymanchem.com/>>)。使用甲醇(MeOH)配制储备液(1 mg/mL)。工作储备液（10 µg/mL，用于制备血浆中的标准曲线样品和QC样品）也使用甲醇制备。大

鼠血浆(K₃EDTA)购自Innovative Research(www.innov-research.com <<http://www.innov-research.com>>)。用血浆制备日常工作溶液，用于生成标准曲线和QC样品。标准曲线的浓度范围为2~500 ng/mL，制备浓度为4、40和400 ng/mL的QC样品。制备血浆标准曲线标准品和QC样品一式三份(N=3)。所有回收率和基质效应实验均使用100 ng/mL浓度的阿哌沙班。LC-MS级甲酸(FA)和磷酸购自Sigma Aldrich (www.sigmaaldrich.com <<http://www.sigmaaldrich.com/>>)。甲基叔丁基醚(MTBE)获自Avantor sciences (www.avantorsciences.com <<http://www.avantorsciences.com>>)。甲醇和乙腈购自Honeywell (lab.honeywell.com <<http://lab.honeywell.com>>)。

Sirocco蛋白沉淀板、Ostro蛋白沉淀和磷脂去除板、Oasis HLB、Oasis PRiME HLB、Oasis方法开发吸附剂选择提取板和Oasis MCX 96孔板均获自沃特世。支撑液液萃取(SLE)板(P/N: 96260-1)获自Analytical Sales and Services (analytical-sales.com)。

回收率和基质效应计算

分析物回收率按照以下公式计算：

$$\text{回收率}\% = \left(\frac{\text{峰面积A}}{\text{峰面积B}} \right) \times 100\%$$

其中，峰面积A = 萃取样品的峰面积，峰面积B = 萃取后向萃取基质样品加入化合物后的峰面积。

基质效应按照以下公式计算：

自动化平台

Andrew+移液机器人，搭配新型Extraction+互联装置，由基于云的OneLab软件控制，用于设计并执行样品前处理和SPE萃取方案。

萃取方案

表1列出了每种技术使用的OneLab数据库方案，图2展示了每种样品前处理方法所用的方案示意图。每种情况下均

按照制造商的说明选择合适的体积和溶剂。除PPT方案中的涡旋步骤和SLE方案中的蒸发步骤外，所有步骤均由Andrew+移液机器人全自动完成。从OneLab数据库

<https://onelab.andrewalliance.com/app/lab/D8xeYomN/library> <

<https://onelab.andrewalliance.com/app/lab/D8xeYomN/library>> 下载标准OneLab方案，用于Ostro、Oasis HLB、Oasis HLB PRiME和混合模式筛选方案。2 × 4方法开发方案还包括加标萃取样品以评估分析物回收率的步骤。使用Sirocco样品板和SLE板创建新的PPT萃取方案。

OneLab Protocols

样品前处理/萃取技术	样品前处理/萃取消耗品	Andrew+移液机器人OneLab数据库方法
PPT	Sirocco蛋白沉淀板	NA (手动执行)
去除PL的PPT:	Ostro蛋白沉淀和磷脂去除板	Ostro蛋白沉淀 - OneLab (andrewalliance.com)
SLE	支撑液液萃取板	NA (手动执行)
RP-SPE:	Oasis HLB 96孔板	自动化生物分析SPE - OneLab (andrewalliance.com)
去除PL的RP-SPE	Oasis PRiME HLB 96孔板	自动化生物分析SPE - OneLab (andrewalliance.com)
混合模式2×4筛选	Oasis方法开发吸附剂选择提取板	Oasis 2×4方法开发 - OneLab (andrewalliance.com)
混合模式SPE	Oasis MCX 96孔板	自动化生物分析SPE - OneLab (andrewalliance.com)

表1.Andrew+移液机器人进行自动化样品前处理和萃取所用的样品萃取方法、样品萃取消耗品以及起始OneLab数据库方案表。

PPT: Waters Sirocco样品板

1 复杂性	向Sirocco板的孔中加入300 μL 乙腈; 向乙腈中加入100 μL 血浆
2 涡旋混合	涡旋混合30秒 (在工作台外)
3 洗脱	在5 psi真空条件下洗脱5分钟

去除PL的PPT: Waters Ostro样品板

1 样品	向Ostro孔中加入200 μL 血浆
2 沉淀	向血浆中加入600 μL 含1%甲酸的乙腈; 抽吸6次混匀
3 洗脱	在5 psi下真空洗脱3分钟

SLE: Analytical sales and service 硅藻土板

1 稀释	用水按1:1的比例稀释200 μL 样品
2 上样	将稀释后的样品取200 μL 上样至SLE板; 低真空保持3秒, 然后等待5分钟
3 洗脱	2 \times 500 μL MTBE - 等待5分钟; 施加高真空30秒
4 蒸发	蒸干 (在工作台外)
5 复溶	加入200 μL 的97:2:1水:乙腈:甲酸进行复溶

RP-SPE: Waters Oasis HLB板

1 稀释	用4% H_3PO_4 按1:1的比例稀释600 μL 血浆
2 上样	将1000 μL 的ptx样品上样至Oasis HLB板
3 清洗	1 mL 95:5水:甲醇
4 洗脱	2 \times 250 μL 甲醇
5 稀释	用500 μL 水稀释

去除PL的RP-SPE: Waters Oasis PRIME HLB板

1 样品稀释	向收集板的孔中加入600 μL 血浆; 用600 μL 4% H_3PO_4 稀释
2 上样	将1000 μL 预处理的样品上样到Oasis PRIME HLB板上
3 清洗	1 mL 95:5水:甲醇
4 洗脱	2 \times 250 μL 90:10 乙腈:甲醇
5 稀释	用500 μL 水稀释

混合模式SPE筛选: 沃特世吸附剂选择提取板

1 样品稀释	向收集板中加入600 μL 血浆; 用600 μL 4% H_3PO_4 或5%浓氨水稀释
2 上样	将1000 μL 的ptx*样品上样到MCX板上
3 清洗	1 mL 2%甲酸水溶液或5%浓氨水
4 洗脱	2 \times 250 μL 甲醇
5 稀释	用500 μL 水稀释

混合模式SPE: Waters Oasis MCX板

1 样品稀释	向收集板中加入600 μL 血浆; 用600 μL 4% H_3PO_4 稀释
2 上样	将1000 μL 的ptx*样品上样到MCX板上
3 清洗	1 mL 2%甲酸水溶液
4 洗脱	2 \times 250 μL 甲醇
5 稀释	用500 μL 水稀释

*ptx = 预处理

图2.从血浆中萃取阿哌沙班的所有样品前处理萃取方案图示。所有方法均基于各制造商维护和使用手册中提供的体

积和溶剂指南。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY I-Class UPLC (FL)
流动相A:	含0.1%甲酸的100% MilliQ水溶液
流动相B:	含0.1%甲酸的100%乙腈溶液
弱清洗溶剂:	水:甲醇(90:10 v/v)
强清洗溶剂:	乙腈:异丙醇:水:甲醇(25:25:25:25 v/v/v/v)
检测:	Xevo TQ-XS质谱仪
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 色谱柱, 1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm (P/N: 186002350)
柱温:	35 °C
柱温:	10 °C
进样体积:	5 μL
流速:	0.5 mL/min

液相色谱梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.5	95	5	6
4.0	0.5	0	100	6
4.5	0.5	0	100	6
4.6	0.5	95	5	6
5.0	0.5	95	5	6

质谱条件

质谱系统: Xevo™ TQ-XS

电离模式: ESI+

采集范围: MRM

毛细管电压: 2.0 kV

锥孔电压: 30 V

脱溶剂气温度: 500 °C

脱溶剂气流速: 1100 L/h

锥孔气流速: 150 L/h

碰撞气体流速: 0.2 mL/min

喷雾器气流: 7 bar

数据管理

仪器控制软件： MassLynx™ (v4.2)

定量软件： TargetLynx™

化合物	离子模式	M+H ⁺	一级碎片离子	一级碰撞能量 (eV)	确认碎片离子	二级碰撞能量 (eV)
阿哌沙班	ESI-Pos	460.2	443.2	30	199.1	35
阿哌沙班- ¹³ C-d ₃ (IS)	ESI-Pos	464.4	447.2	30	203.1	35

表2. 阿哌沙班和内标阿哌沙班¹³C-d₃的MS分析器参数。

LC-MS分析

阿哌沙班的色谱分离采用Waters ACQUITY I-Class UPLC和ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(1.7 μm, 2.1 × 50 mm)，使用含0.1%甲酸的水和乙腈流动相进行梯度洗脱。流速设置为0.5 mL/min，柱温设置为35 °C。使用Waters Xevo TQ-XS质谱仪ESI+模式，通过多重反应监测(MRM)检测分析物。阿哌沙班及其内标（阿哌沙班¹³C-d₃）的质谱条件见表2。

磷脂监测

残留磷脂分析使用与阿哌沙班分析相同的UPLC梯度进行。质谱条件请参见表3。

化合物	离子模式	锥孔电压(V)	母离子	碰撞能量(eV)	母离子扫描	扫描时间
磷脂	ESI-Pos	30	184.1	30	400-1000 m/z	1 s

表3. 用于监测磷脂的MS分析器参数。

结果与讨论

自动化

使用Andrew+移液机器人搭配Extraction+互联装置，通过上述多种常用样品前处理技术以及图2所示的方案，对血浆样品中的药物阿哌沙班进行萃取。所有移液、试剂添加、样品预处理和萃取装置的操作均完全自动化，人工干预仅限Sirocco样品板的加盖和涡旋步骤，以及SLE萃取期间的溶剂蒸发步骤。Extraction+互联装置具有流通式废液收集功能，还可以自动将样品萃取板和收集实验器皿放置到Extraction+萃取装置上，实现了全自动化的样品萃取。图3展示了配置有Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人。使用配置有Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人执行初始方法评估实验，例如确定回收率和基质效应，以及定量萃取标准曲线和QC样品。

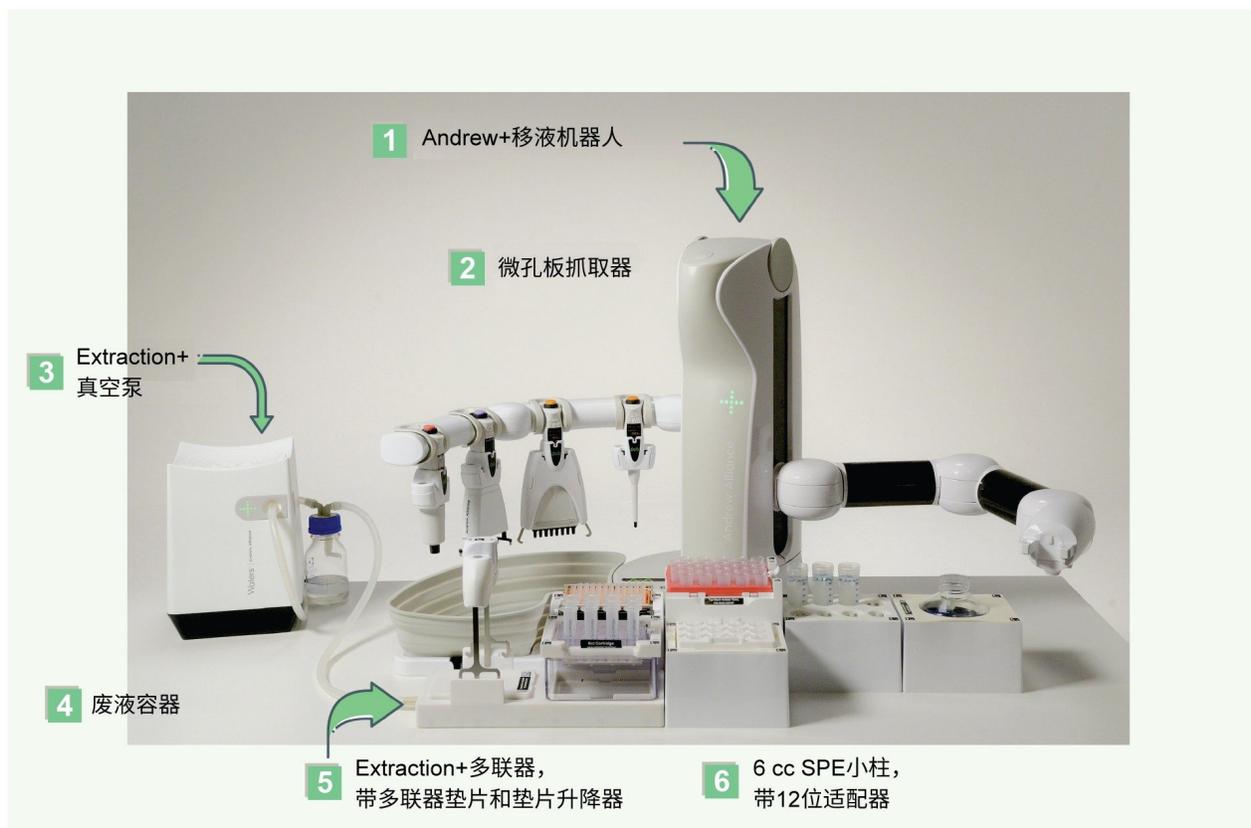


图3. Andrew+移液机器人（配有所需*Domino*）、Andrew Alliance蓝牙电子移液枪和工具支架上的微孔板抓取器，以及Extraction+互联装置（包括连接的真空泵、流通式废液容器、用于萃取板或小柱的Extraction+多联器（带多联器垫片和一体化垫片升降器））。

Andrew+移液机器人OneLab萃取方案

图4所示为OneLab软件生成的用户界面示例。这一特定的OneLab方案使用Oasis HLB 96孔板对阿哌沙班进行SPE萃取，该方案使用表1中列出的自动化生物分析SPE库方法创建。图中展示了使用OneLab为Andrew+移液机器人创建的工作台布局及其方案，图中显示了所有*Domino*和互联装置的位置。对于其他OneLab萃取方案也创建了类似的列表和布局。

色谱分析

图5展示了实验部分所述LC条件下阿哌沙班的色谱分离结果。图A显示了低浓度标准曲线样品(2 ng/mL)萃取血浆样品与空白萃取血浆样品的比较结果,图B突出显示了3个质量控制(QC)萃取血浆样品(阿哌沙班浓度分别为4、40、和400 ng/mL)下的色谱性能。ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm)可提供一致的色谱图,无内源性干扰物。残留极少,方法空白的峰强度低于最低浓度标准曲线样品峰强度的10%。

回收率和基质效应

萃取效率和洁净度评价是所有生物分析程序中的关键步骤。这是通过计算目标分析物的回收率和基质效应来完成的,详细方法请参见“材料与方法”部分。图6显示了各种样品前处理程序的回收率和基质效应(ME)结果。样品前处理技术按选择性从低到高排列,从更通用的方法(例如蛋白沉淀)开始,到选择性和特异性更高的混合模式SPE程序。总体趋势为,回收率随着方法特异性的提高而提高,基质效应相应降低。虽然Sirocco PPT和去除PL的Ostro PPT处理的样品具有可接受的回收率,但其基质效应较大(>25%),而SLE处理的样品回收率在所有技术中最低。需要注意的是,该技术或任何技术都只进行了少量优化,因为我们的目标之一是遵循所有产品推荐的方案。性能有望通过进一步的方案优化得到改善。对于SPE技术,这种性能改善模式更为明显。所有SPE技术均获得了足够高的回收率(>80%),基质效应从Oasis HLB的-40%降至HLB PRiME的-13.6%,而使用Oasis MCX时基质效应更是微乎其微(2.4%)。在使用吸附剂选择提取板进行筛选时,Oasis MCX表现出优于WAX的性能,因此选用该吸附剂进行后续的定量分析。筛选的其他混合模式溶剂(WCX和MAX)的回收率可忽略不计,因此未在图中显示。需要注意的是,混合模式吸附剂使用的是从吸附剂选择板洗脱的第一次洗脱液。阿哌沙班不可电离,预计不会通过离子交换与混合模式吸附剂结合,因此我们能够单独在甲醇组分中洗脱,同时仍可利用混合模式吸附剂的离子交换特性,相较于RP-SPE技术,可为提供额外的纯化作用。如上文所述,该方法能够筛选所有4种混合模式Oasis吸附剂,从而快速确定适用于此次分析的理想混合模式SPE吸附剂。

磷脂残留

残留磷脂(PL)按照“材料和方法”部分所述方法进行监测。本研究根据样品浓度或稀释度校正残留磷脂迹线的绝对MS强度,并绘制在图7中。不出所料,使用Sirocco样品板的简单PPT获得的PL最多。使用Ostro PPT板显著降低了血浆萃取物中的PL含量,与预期一致。SLE制备的样品中残留的PL可忽略不计,这一点已在之前的研究中发现[72006516]³。在传统SPE流程中,使用Oasis HLB的反相SPE的PL浓度最高,尽管与PPT相比已经有所减少。与标准反相SPE相比,Oasis HLB PRiME和Oasis MCX萃取将残留PL减少了近90%。这些数据为流程的质量以及洁净度提供了更多信息。我们将该数据与图7所示的回收率和基质效应数据相结合,可以全面了解样品萃取流程的质量。在本例中,我们看到,使用Oasis MCX获得了理想的回收率,基质效应极小,残留PL水平也很低。

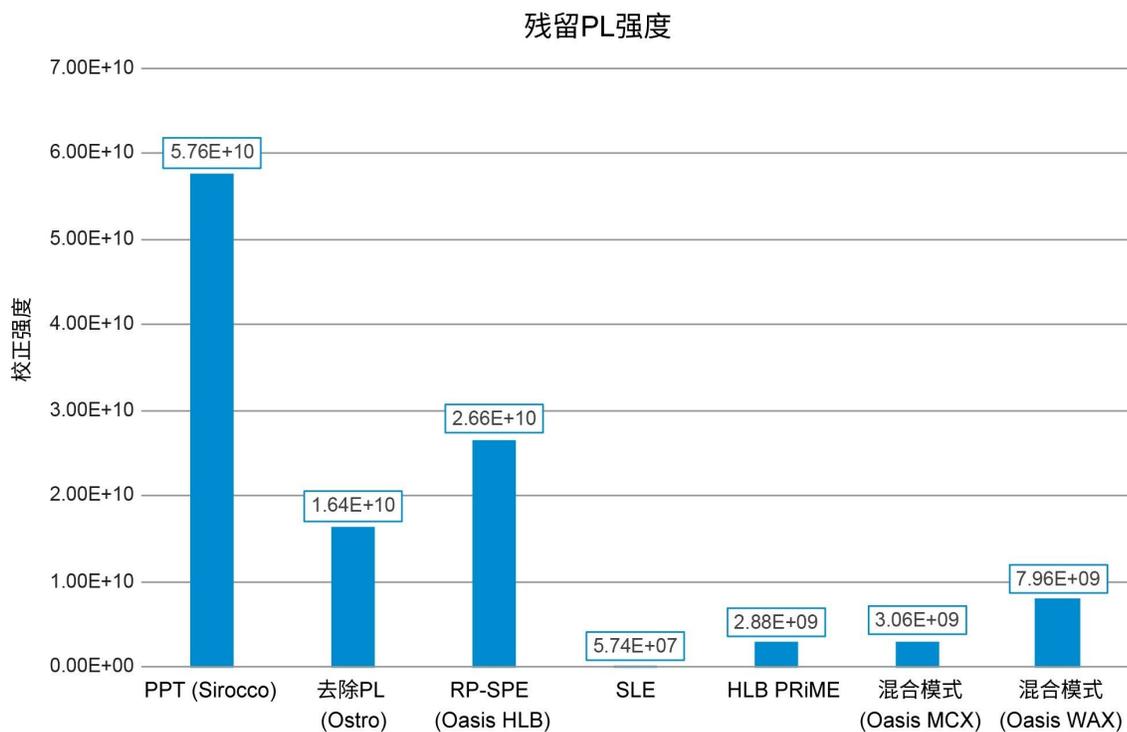


图7. 每种样品前处理技术检测到的残留磷脂MS强度。所有数值均根据样品体积和稀释度进行了校正。

定量分析结果

虽然图6和图7中的定性数据为样品前处理方法的选择提供了宝贵的信息，但生物分析方法的最终目标是获得准确、精密且一致的定量数据。下面的表2和表3汇总了采用上述样品前处理技术自动萃取标准品和QC血浆样品得到的定量结果。所有样品前处理技术的标准曲线范围为2~500 ng/mL。表2显示，标准曲线样品的准确度在86%~111%的范围内，RSD < 15% (N=3)，其中许多为个位数。这一结果能够轻松满足推荐的生物分析方法验证指南标准。表3汇总了每种技术的定量分析结果。如表3所示，尽管不同技术在回收率和基质效应方面存在显著差异（图6），但所有萃取技术的定量性能均非常出色，平均QC准确度均在标示值的10%以内。精密性也非常出色，%RSD值均在个位数，除一个样品外，所有精密度的%RSD均低于5%。

标准曲线性能					
萃取技术	线性动态范围	R ²	曲线加权	%准确度范围 (N=3)	%RSD范围 (N=3)
PPT (Sirocco)	2-500 ng/mL	0.993	1/x ²	92.4-105.5	0.2-3.7
去除PL的PPT(Ostro)		0.997		97.6-103.4	0.2-14.9
SLE		0.993		86.0-109.1	0.4-6.1
反相SPE (HLB)		0.996		93.4-109.9	0.7-2.4
去除PL的反相SPE (Oasis PRIME HLB)		0.986		87.9-110.8	0.3-3.8
混合模式SPE (MCX)		0.996		94.2-109.7	0.2-3.7

表2. 使用配置Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人制备和萃取获得的血浆标准曲线的定量性能。表中列出了每种样品前处理技术的线性动态范围、曲线拟合、准确度%和RSD%。

结论

本应用纪要重点介绍了一种简化的生物分析萃取策略，无需开发方法即可成功萃取血浆中的阿哌沙班，实现了高于75%的分析物回收率，并具有出色的重现性。各种萃取技术的定量性能优异，线性动态范围为2~500 ng/mL，从血浆中萃取阿哌沙班的QC准确度 $\geq 90\%$ ，RSD $\leq 10\%$ 。在进行更具特异性的样品前处理时（在本例中为Oasis MCX），获得了最高的回收率、最低的基质效应和低磷脂残留。其他技术在洁净度和/或回收率方面存在一定的利弊权衡。该应用表明，即使是被认为较复杂的样品前处理技术，也可以使用通用方法，无需进行额外的方法开发，即可产生出色的结果。通用方案与Andrew+移液机器人（配置Extraction+互联装置）的自动化样品前处理方案相结合，可极大地简化样品萃取流程，大幅提高实验室生产力，减少错误，并确保分析方法的整体性能。

参考资料

1. Zhang, X., Danaceau, J., and Chambers, E. 使用新型固相萃取吸附剂Oasis PRiME HLB改善回收率、重现性和基质效应, 沃特世应用纪要, [720005495ZH](#), 2015年9月.
2. Danaceau, J., Wood, M. and Calton, L. Simultaneous Analysis of Diuretics and Beta-Blockers by Mixed

Mode SPE and UPLC-MS/NS for Anti-Doping Analysis, Waters Application note. [720006515](#), March 2019.

3. Danaceau, J., Haynes, K., and Chambers, E. A Comprehensive Comparison of Solid Phase Extraction (SPE) vs. Solid Liquid Extraction (SLE) vs. Liquid Liquid Extraction (LLE) Sample Prep Techniques in Bioanalysis and Forensic Toxicology Analyses, Waters Application note. [720006060](#), August 2017.

特色产品

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

[Xevo TQ-S质谱仪 <https://www.waters.com/10160596>](https://www.waters.com/10160596)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

720007946ZH, 2023年7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](#)