

采用Ostro 96孔样品制备板轻松提高DBS萃取物的洁净程度

Jessalynn P. Wheaton, Erin E. Chambers和Kenneth J. Fountain

应用优势

- 使用更快的孔内分析方式，更简洁的单步提取法进行DBS提取
- 去除99.9%磷脂
- 消除磷脂在LC色谱柱中的蓄积，提升方法稳定性

沃特世解决方案

Xevo® TQ-S MS系统

ACQUITY UPLC® BEH C₁₈柱

Ostro™ 96孔样品制备板

关键词

干血斑，磷脂去除，Ostro

引言

干血斑分析法（DBS）在医药行业正变得愈发重要。动物实验所带来的经济及伦理道德方面的问题，以及在运输以及储存生物样品时所产生的高额费用问题，都使得DBS分析法成为一种颇具吸引力的选择。DBS分析法可取得较高的分析物回收率。然而，该技术在去除内源性干扰方面收效甚微。以残余磷脂（PLs）为主的干扰物是生物分析中遇到的主要问题。而LC/MS/MS系统中PLs的蓄积，则是引发基质效应的主要原因。在所有其他问题之中，基质效应会以无可预测的方式影响质谱响应值，降低分析方法稳定性并增加其可变性。Ostro 96孔样品制备板则可消除99%以上的PLs残留。Ostro 96孔板可通过使用96孔制备板的形式进一步简化DBS萃取流程，同时提取分析物、去除磷脂、过滤干血斑纸片。DBS样品可在孔内萃取并稀释直接进样到LC/MS/MS系统中。该创新方法能够显著降低样品制备时间，并在萃取转化、干燥、复溶过程中避免潜在的分析物流失。在本应用纪要中，我们同时应用了传统方法和Ostro 96孔样品制备板方法，对含有利培酮、利培酮羟基化代谢物、9-OH利培酮及其内标氯氮平（图1）的全血样品进行了萃取。

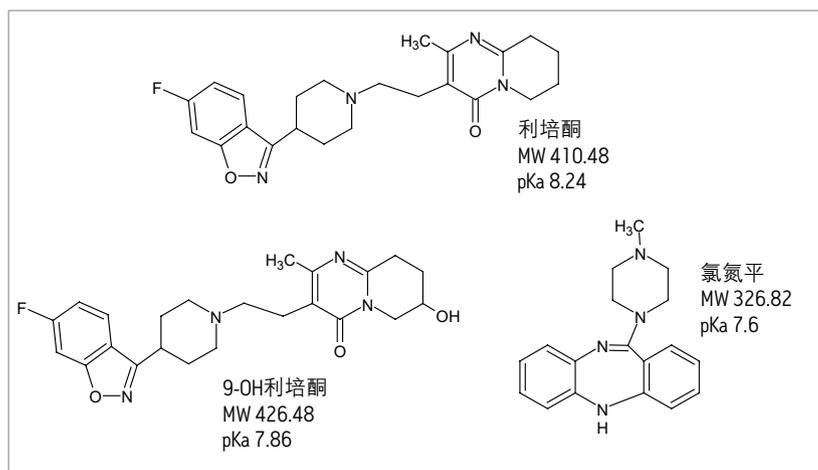


图1. 利培酮、9-OH利培酮和氯氮平的分子结构、分子量和pKa值。

实验部分

ACQUITY UPLC条件

色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 × 50 mm, 1.7 μm
流动相A:	0.1% NH ₄ OH 水溶液
流动相B:	50/50 ACN/MeOH
流速:	0.6 mL/min
梯度:	时间 梯度模式 梯度线型 (min) %A %B
	0.0 75 25 6
	2.0 0.5 99.5 6
	3.0 0.5 99.5 6
	3.1 75 25 6
	3.5 75 25 6
进样量:	40 μL
进样模式:	部分环进样
柱温:	35 °C
样品温度:	15 °C
强洗针液:	60:40 ACN:IPA + 2% HCOOH
弱洗针液:	95/5 H ₂ O/MeOH

沃特世Xevo TQ-S MS运行条件, ESI⁺

毛细管电压:	3.0 V
脱溶剂温度:	550 °C
锥孔气流速:	150 L/Hr
脱溶剂气流速:	1000 L/Hr
碰撞池压力:	2.6 × 10 ⁽⁻³⁾ mbar
MRM通道监测, ESI ⁺	参见表1

表1. 利培酮、9-OH利培酮和氯氮平的MRM通道、碰撞能量和锥孔电压。

化合物名称	母离子	子离子	碰撞能量 (eV)	锥孔电压 (V)
利培酮	411.1	190.9	28	46
9-OH利培酮	427.1	109.8	38	42
氯氮平	327.0	269.7	22	42

样品制备条件

将20 μL的全血样品滴在未经处理的Whatman DMPK-C血卡上。样品随后在室温下干燥2小时。使用Harris 3 mm微打孔器取3 mm血斑, 分别放置进传统型DBS萃取法所需的1.5 mL离心管和Ostro 96孔板孔中。传统萃取方法在1.5 mL离心管中进行, 使用了250 μL含5%水的甲醇溶液, 随后样品进行1分钟涡旋、1分钟3000 g离心, 并最终将萃取物转移至96孔板上。使用Ostro 96孔板的萃取则采用单步孔内萃取法。在Ostro 96孔板中添加3 mm干血斑 (图2)。以250 μL含5%水的甲醇溶液作为萃取溶液, 涡旋操作1分钟、真空操作5分钟。两种方法产生的洗脱液都用250 μL的水进行稀释, 然后进样到LC/MS/MS系统中。

基本方法



图2. 采用Ostro 96孔板的干血斑萃取流程。

结果与讨论

在正离子模式下进行MS分析。鉴于DBS萃取物的直接进样通常会导致极稀释的样品，我们采用Xevo TQ-S以显著提升系统的灵敏度。这同时也有助于直接进样，并避免了吹干、复溶过程中可能存在的问题。

针对每一种样品制备方法，我们都比较了磷脂残留量。为了达成这一目的，我们对单个试管萃取和使用Ostro PLR板孔内萃取的DBS进行了比对，对五种磷脂进行了量化。与传统型DBS分析法相比，Ostro板去除磷脂比例高达99.9%（图3）。为能直观展示残余磷脂，传统型DBS萃取法和使用Ostro的孔内DBS萃取法所产生的五种不同磷脂的总离子流（TIC）如图所示（图4）。当使用Ostro板时，磷脂残留量几乎可忽略不计，且无蓄积情况。而当使用传统型DBS法时，即便出于预防磷脂蓄积的目的，采用高比例有机溶剂进行了1分钟的清洗，磷脂残余量依旧显著，而且在整个过程中都有蓄积。

我们进行了半验证，计算QC样品浓度不足预期值的15%，满足法规标准。9-OH利培酮（图6）及其母化合物LLOQ在全血中都达到0.05 ng/mL。标准曲线在3个以上数量级呈线性，全血中的线性范围从0.05 ng/mL到50 ng/mL（图7）。

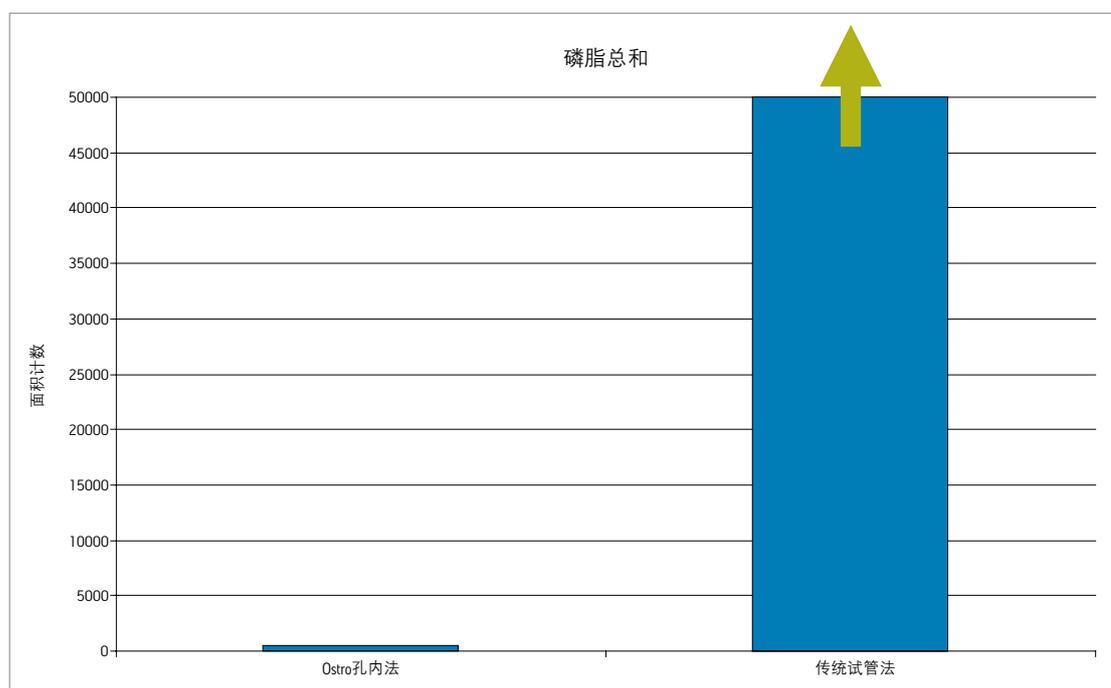


图3. 使用Ostro 96孔板孔内萃取法和传统试管萃取法生成的磷脂面积计数总和对比， $n=4$ 。两种方法的萃取溶液均为95/5甲醇/水。5种求和的磷脂母离子质量分别为496、522、704、758和806。

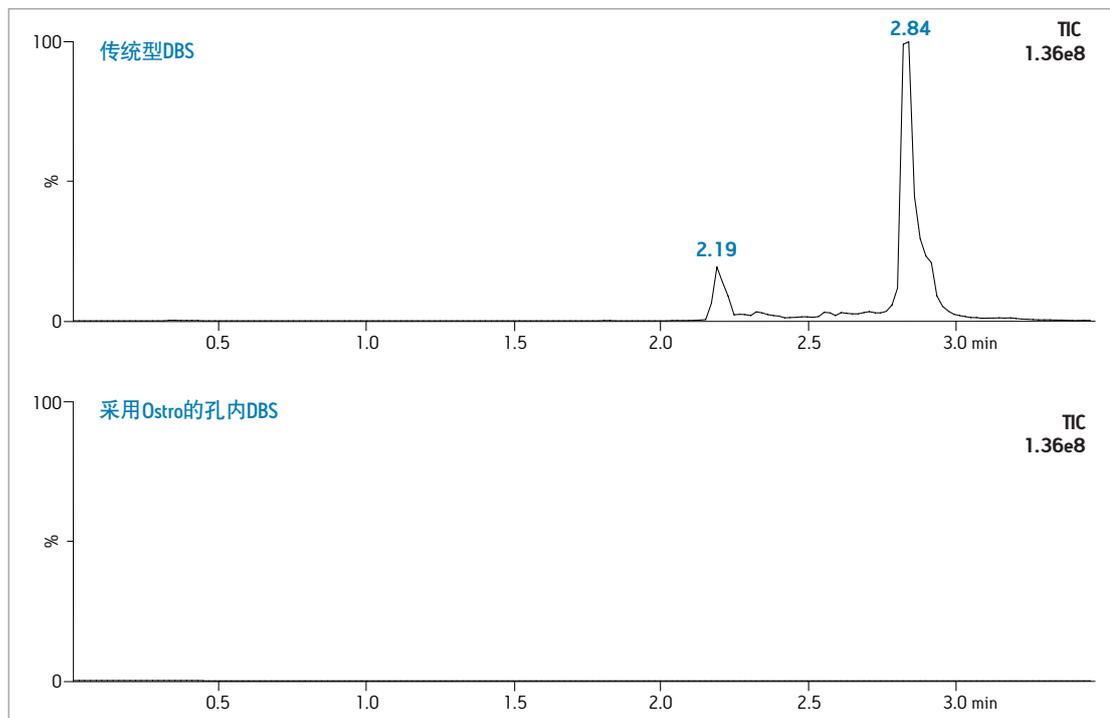


图4. 传统型DBS萃取和使用Ostro板的DBS孔内萃取条件下，5中磷脂成分总离子流图 (TIC)。

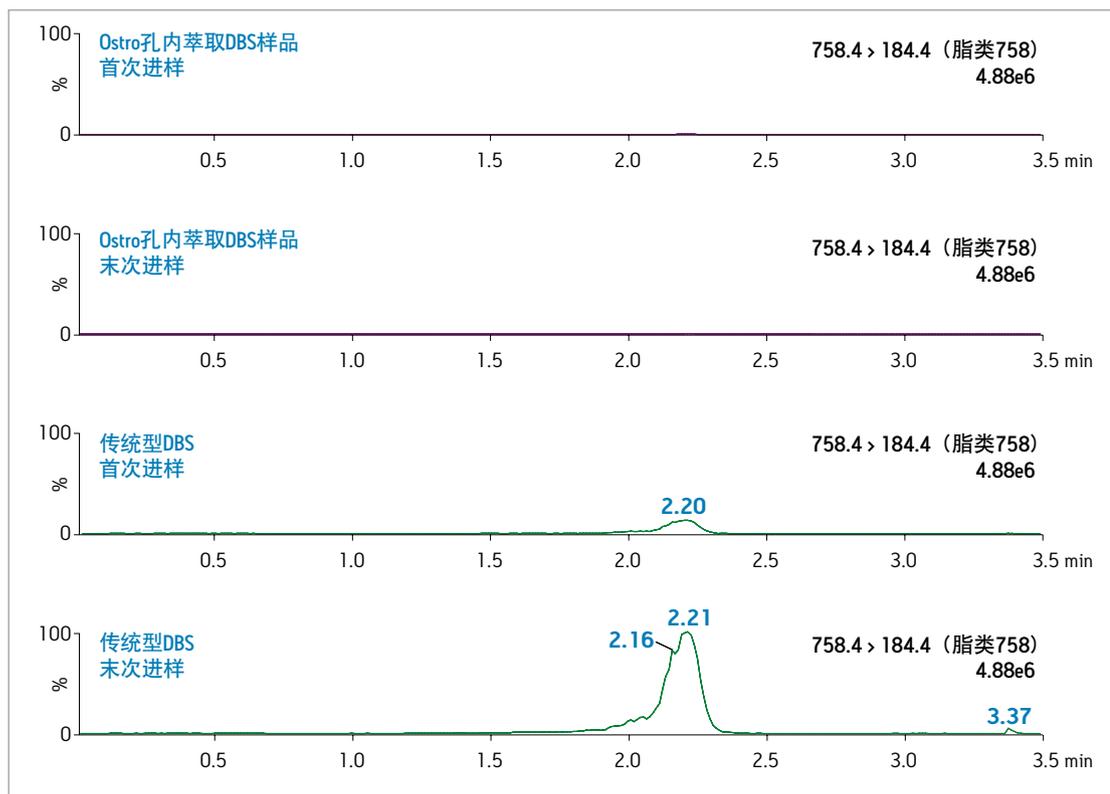


图5. MRM通道758>184色谱图，用于展示在传统型DBS和使用Ostro板孔内DBS萃取方法下单个PL在连续进样后的累积情况。采用2分钟、25-99.5% B 梯度，随后保持高有机溶剂1分钟以冲洗色谱柱。

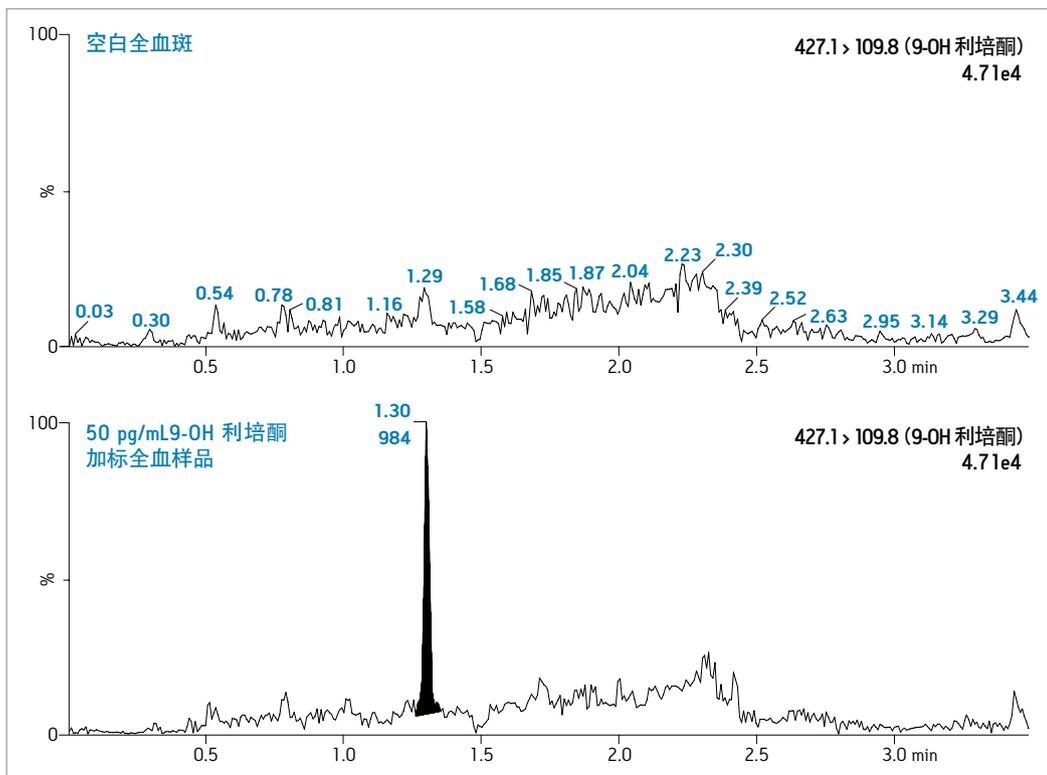


图6. 空白DBS和使用Ostro 96孔板萃取法后直接进样0.05 ng/mL 9-OH利培酮DBS萃取物的色谱图。

名称	类型	标准浓度	Rt	面积	IS面积	响应值	浓度	%偏差
0_05_direct_inject_042011_001	标准品	0.05	1.53	945	37691	37691	0.05	4.0
0_1_direct_inject_042011_001	标准品	0.10	1.52	1146	37531	37531	0.10	-4.5
0_25_direct_inject_042011_001	标准品	0.25	1.53	1682	35798	35798	0.23	-9.3
0_5_direct_inject_042011_001	标准品	0.50	1.53	3392	40329	40329	0.52	4.5
1_direct_inject_042011_001	标准品	1.00	1.53	5114	39457	39457	0.88	-11.5
5_direct_inject_042011_001	标准品	5.00	1.52	28760	38637	38637	5.78	15.7
10_direct_inject_042011_001	标准品	10.00	1.52	57317	42923	42923	10.49	4.9
25_direct_inject_042011_001	标准品	25.00	1.52	156098	51934	51934	23.80	-4.8
50_direct_inject_042011_001	标准品	50.00	1.52	289427	45519	45519	50.51	1.0
0_075_QC_direct_inject_042011_001	QC	0.075	1.52	1467	51641	51641	0.08	4.8
0_75_QC_direct_inject_042011_001	QC	0.75	1.52	4473	44994	44994	0.64	-14.1
7_5_QC_direct_inject_042011_001	QC	7.50	1.52	48110	49944	49944	7.53	0.4
15_QC_direct_inject_042011_001	QC	15.00	1.52	96139	42200	42200	18.00	20.0

图7. 9-OH利培酮全血样品典型校准曲线和QC样品, $R^2=0.991$, $1/x^2$ 加权。

结论

- 简便、单步的DBS样品制备方法
- 相较于传统的DBS萃取技术, 去除残余磷脂含量高达99.9%
- 采用Xevo TQ-S质谱仪, 获得高灵敏度
- 去除LC色谱柱中PLs的蓄积

北京分公司

北京市朝阳区铜牛国际大厦
光华路15号院2号楼9层
电话：010-5209 3866
传真：010-5293 2298

广州分公司

广州市荔湾区中山七路50号
西门口广场1707-08室
电话：020-2829 6555
传真：020-2829 6556

成都分公司

成都市新光华街7号
航天科技大厦1803室
电话：028-6554 5999
传真：028-6554 5998

沃特斯中国有限公司

香港新界沙田香港科学园
科技大道西2号生物资讯中心6楼608室
电话：852-2964 1800
传真：852-2549 6802

免费售后服务热线：

800 (400) 820 2676

沃特世科技（上海）有限公司

上海市浦东新区金海路1000号
金领之都13栋
电话：021-6156 2666
传真：021-6156 2777
www.waters.com



Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、ACQUITY UPLC、
Xevo和Ostro是沃特世公司的商标。

©2011 年沃特世公司。印制于中国
2011年7月 720004047ZH KK-PDF