

基于 Cleanert SLE 高通量萃取血清中辛伐他汀及辛伐他汀酸

一 背景

辛伐他汀是 3-羟基-3-甲基-戊二酰 CoA 还原酶(HMG-CoA)抑制剂,为不活泼内酯药物,口服吸收达到肝脏后,大部分转化为活性代谢物辛伐他汀羟基酸发挥作用。辛伐他汀能明显降低总胆固醇及 LDL 胆固醇的量,减少甘油三酯及提高高密度脂蛋白胆固醇的含量。临床上,辛伐他汀对治疗杂合家族史高脂血症及伴有肾病综合征高脂血症有明显疗效。同时测定血浆中辛伐他汀和其活性代谢物辛伐他汀羟基酸的浓度,得到血药浓度与时间的函数关系,合并计算有关药物动力学参数及生物利用度,更有实际意义^[1]。

本应用案例介绍一种液相色谱-串联质谱的方法,采用 Cleanert SLE 96 孔板净化血清样品,从血清样品中萃取富集辛伐他汀和辛伐他汀酸,实验方法具有良好的稳定性及可靠性,可为辛伐他汀和辛伐他汀酸临床研究提供一种解决方案。

二 目标物信息

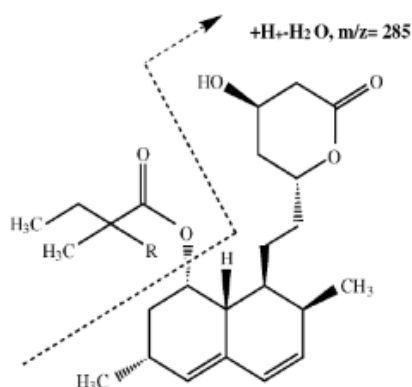


图 1 辛伐他汀结构图

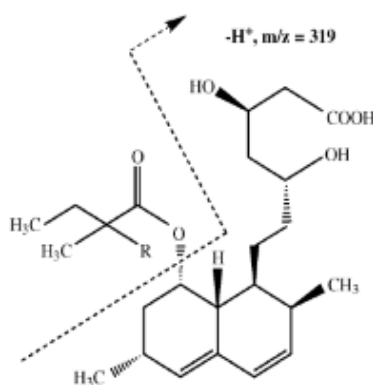


图 2 辛伐他汀羟基酸结构图



三 材料及仪器

Cleanert SLE 96 孔板 (200mg/well), Cleanert V96 样品氮吹浓缩仪, 96 孔收集板, 96 孔硅胶盖板, Kinetex F5 (2.1*50 mm, 2.6 μ m) 色谱柱, 以上产品均为天津博纳艾杰尔科技有限公司产品; LC-MS/MS, API 4000+ (SCIEX); 96 位微孔板恒温振荡器, 辛伐他汀标准品 (购自中国药品生物制品检定所); 辛伐他汀羟基酸钠标准品 (购自 Toronto Research Chemicals); 乙腈; 甲酸; 水; 乙酸铵; 乙酸; 甲基叔丁基醚。

四 样品处理方法

4.1 样品预处理

由于辛伐他汀与辛伐他汀羟基酸存在相互转化过程, 为阻止这一过程需要样品在酸性缓冲液条件下进行提取, 所用缓冲液体系为乙酸-乙酸铵。

取 100 μ L 血浆至洁净样品瓶中, 加入内标溶液, 再加入 100 μ L 缓冲液, 涡旋振荡混匀。

4.2 SLE 过程

上样: 将预混合好的溶液全部上样, 静置 5 min;

洗脱: 2 mL 甲基叔丁基醚洗脱, 每次加入 500 μ L, 分四次洗脱, 合并洗脱液; 最后一步洗脱结束, 将 Cleanert SLE 与收集板整体放到 Cleanert V96 96 孔样品氮吹浓缩仪上 37 度氮干。

重溶: 氮干后收集板中加入 200 μ L 甲醇并覆盖硅胶盖板后置于 96 位微孔板恒温振荡器混匀, 滤进样检测。

五 仪器检测条件

5.1 HPLC 条件

色谱柱: Kinetex F5 (2.1*50 mm, 2.6 μ m)

流速: 400 μ L/min

柱温: 30 $^{\circ}$ C

进样量: 3 μ L

流动相条件: 乙腈: 4mM 乙酸铵+0.1%甲酸梯度分离

5.2 质谱条件

扫描模式: 电喷雾电离正模式



采集模式：多反应监测（MRM）

表 1 参数信息

化合物	保留时间/min	Q1	Q3	CE
辛伐他汀	4.02	419	199	15
		419	285	15
辛伐他汀羟基酸	3.80	437	303	15
		437	285	18

六 结果

6.1 线性范围与灵敏度

根据目标物在人体内的含量范围确定标准曲线浓度范围，试验中使用不含目标物的血浆样品配制 7 个不同浓度的校准曲线点，辛伐他汀的浓度分别为：10、20、50、100、150、300、500 ng/mL；辛伐他汀羟基酸的浓度分别为：10、20、50、100、150、300、500 ng/mL；所得样品采用上述样品前处理方法净化样品并进行检测，获得结果见表 2。

表 2 线性及灵敏度

化合物	回归方程	相关系数 (r^2)
辛伐他汀	$y = 20.8x + 67.8$	0.9998
辛伐他汀羟基酸	$y = 110x + 318$	0.9990

6.2 方法精密度与准确度

为考察方法精密度与准确度，取低、中、高三个浓度的样本，每个浓度平行处理 6 个样，获得数据见表 3。

表 3 精密度与准确度

化合物	加标浓度 ng/mL	平均回收率 (n=3)	RSD (n=3)
辛伐他汀	10	104.6%	8.5%
辛伐他汀羟基酸	10	107.3%	5.5%

化合物	加标浓度 ng/mL	平均回收率 (n=4)	RSD (n=4)
辛伐他汀	20	95.0%	7.4%
辛伐他汀羟基酸	20	105.5%	10.6%

化合物	加标浓度 ng/mL	平均回收率 (n=6)	RSD (n=6)
-----	---------------	----------------	--------------



辛伐他汀	50	92.2%	7.4%
辛伐他汀羟基酸	50	102.8%	8.3%

6.3 绝对回收率

使用甲醇配制 7 个不同浓度的校准曲线点，辛伐他汀的浓度分别为：10、20、50、100、150、300、500 ng/mL；辛伐他汀羟基酸的浓度分别为：10、20、50、100、150、300、500 ng/mL；使用该标准曲线对添加 50ppb 的血清样品进行净化样品并检测，获得结果见表 4、5。

表 4 线性及灵敏度

化合物	回归方程	相关系数 (r^2)
辛伐他汀	$y = 23x - 38.4$	0.9928
辛伐他汀羟基酸	$y = 173x - 2.08e+003$	0.9936

表 5 精密度与准确度

化合物	加标浓度 ng/mL	平均回收率 (n=3)	RSD (n=6)
辛伐他汀	50	96.7%	8.75%
辛伐他汀羟基酸	50	95.1%	9.91%

6.4 色谱图

将经 Cleanert SLE 净化的样品按上述 LC-MS/MS 测试条件进行测试，获得谱图见图 3、4。

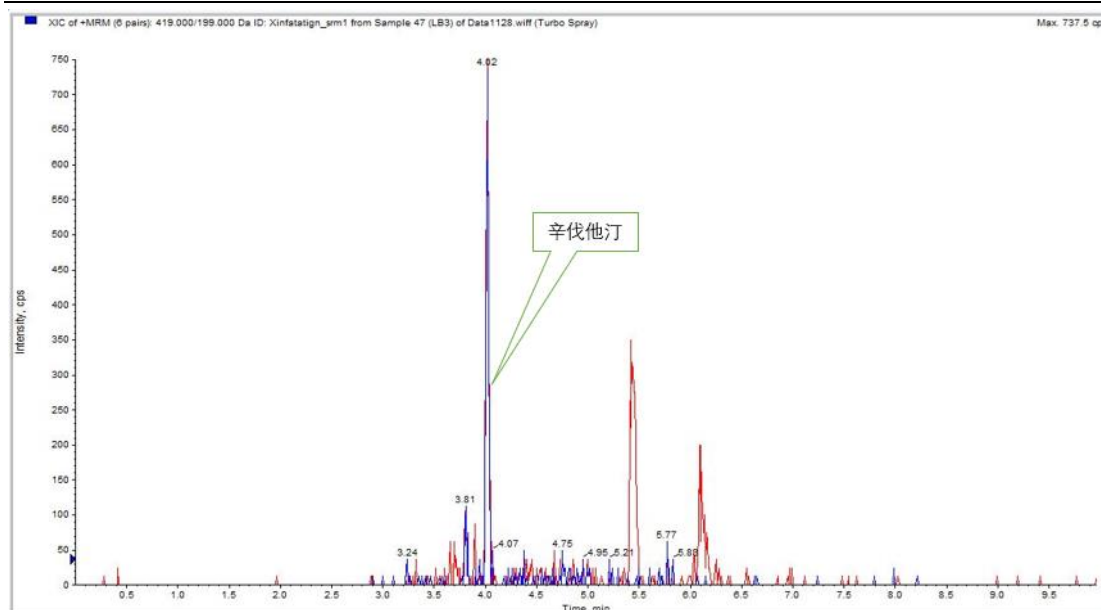


图 4 辛伐他汀血浆加标色谱图（浓度为 50ng/mL）

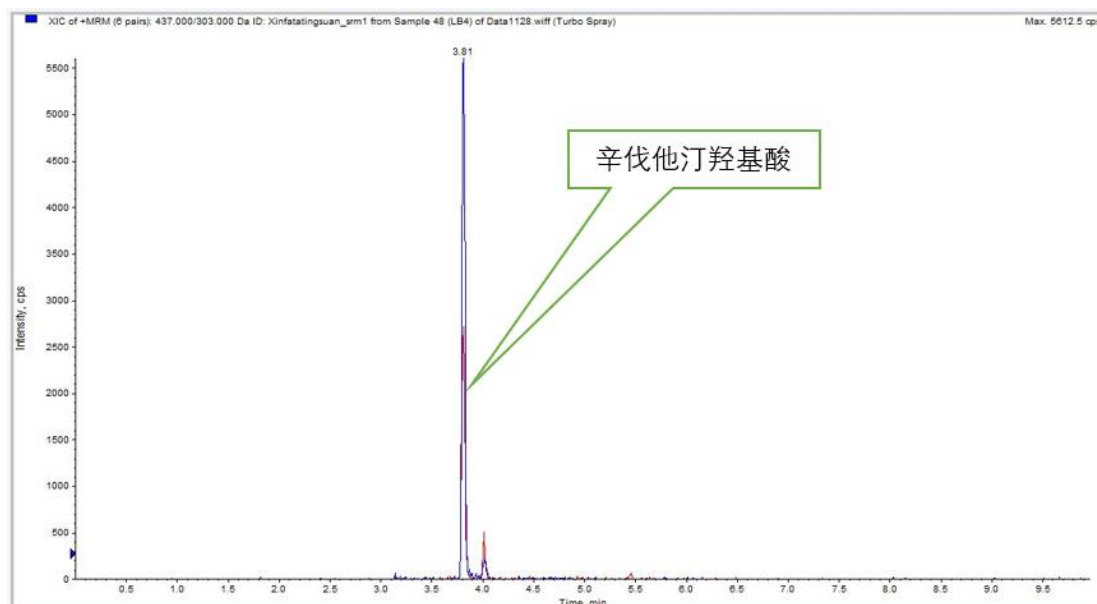


图 5 辛伐他汀羧基酸血清加标色谱图（浓度为 50ng/mL）

七 结论

本应用介绍了一种简单、高效的样品前处理方法，通过 Cleanert SLE 96 孔板可高通量净化血样并萃取富集辛伐他汀及辛伐他汀酸，本实验方法易操作且稳定，可在临床研究及药物代谢领域替代耗时、低效的液液萃取技术。

八 订货信息表



产品名称	规格/包装	订货号
Cleanert SLE 96 孔板	96 孔板, 200mg/well	HC2002-9W
Cleanert V96 样品氮吹浓缩仪	与 96 孔板匹配	NV-96G
96 孔收集板	2mL/well, 与 96 孔板匹配	96SP2036-Y
Kinetex F5	3.0*50mm, 2.6μm	00B-4723-Y0
96 孔收集板盖板	与 96 孔收集板匹配	96GP10036-M

参考文献

1. UPLC-MS / MS 法同时测定人血浆中辛伐他汀和辛伐他汀羟基酸的浓度 药物分析杂志
2012, 32 (9)