

利用自动化平台简化工作流程：利用 Hamilton Microlab STAR进行样品前处理和萃取以准确检测药物

Kathryn Brennan, Jonathan P. Danaceau, Robert Wardle, Mary E. Lame

Waters Corporation



仅适用于法医毒理学应用。

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本研究旨在提供一种实用且广泛适用的自动化SPE策略，以准确、可重现地定量分析尿样中的滥用药物和镇痛药物，为法医毒理学的临床研究提供支持。将先前经过验证的方法转移至Hamilton Microlab STAR，除执行完整的SPE程序以外，该平台还执行所有样品预处理工作。这些自动化策略可简化样品前处理工作流程，提高生产率，并降低人为错误的风险，同时确保获得优异的分析性能。

优势

- 自动完成重复任务
- 降低人为错误的风险
- 稳定、可重现的SPE方法
- 使科学家有更多时间执行其他任务

简介

目前，液相色谱与质谱联用系统(LC-MS/MS)是通过单次采集快速分析多种化合物的常用技术。然而，虽然仪器分析取得了进步，但样品前处理仍然可能是限速环节，并且是整个生物分析工作流程中产生错误的来源¹。由于LC-MS/MS生物分析要求较高的灵敏度、选择性和稳定性，通常选择的样品前处理技术包括简单稀释、蛋白沉淀(PPT)、液液萃取(LLE)、载体液液萃取(SLE)和固相萃取(SPE)。这些方法的开发、优化和实施可能会非常耗时，尤其是分析大型分析物组合时，并且难以在科学家和实验室之间转移。采用全自动装置（如Hamilton Microlab STAR）可简化样品前处理流程，使分析人员有更多时间专注于其他任务。而更重要的可能是降低人为错误几率，例如错误加标、内标添加错误、操作方法不一致以及样品转移错误²⁻⁵。从而提高分析方法的重现性和一致性。

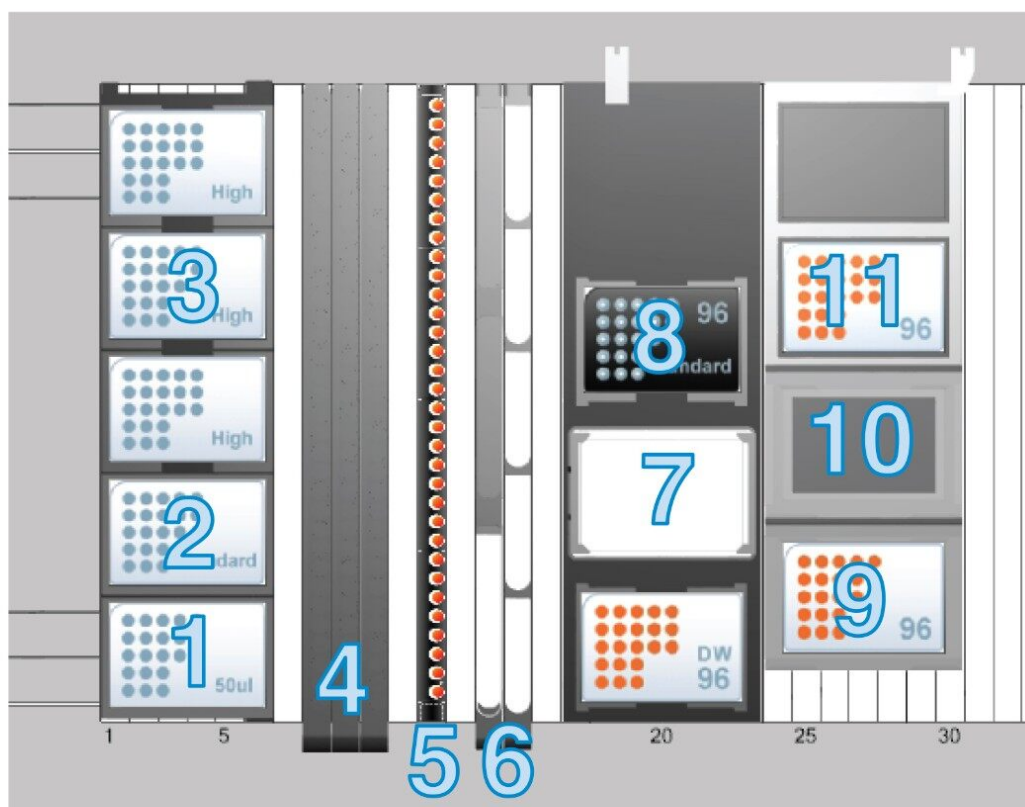
本研究旨在提供一种实用且广泛适用的自动化SPE策略，以准确、可重现地定量分析尿样中的滥用药物和镇痛药物，为法医毒理学的临床研究提供支持。将先前经过验证的方法转移至Hamilton Microlab STAR，除执行完整的SPE程序以外，该平台还执行所有样品预处理工作⁶。这些自动化策略可简化样品前处理工作流程，提高生产率，并降低人为错误的风险，同时确保获得优异的分析性能。

实验

所有标准品均购自Cerilliant（德克萨斯州圆石）和Cayman Chemical（密歇根州安阿伯）。用甲醇配制浓度为2、10和25 µg/mL的混合储备液，具体取决于分析物种类。使用稳定同位素标记的标准品作为内标 (IS)。用甲醇配制浓度为1 µg/mL的内标储备液⁶。通过将储备液稀释到混合空白尿液中制得样品。

样品提取

进行固相萃取之前，使用混合空白尿液手动制备所有校准标样和质量控制样品。萃取过程使用的Hamilton Microlab STAR工作台布局和附件如图1所示。另外手动执行提取过程以比较四个QC水平下的准确度和精密度。在预处理过程中，利用STAR液体移取器将100 µL IS加入水解缓冲液，然后将100 µL尿液加入Oasis MCX µElution提取板的各个孔中，通过抽吸混合样品。温育后，利用STAR加入200 µL 4% H₃PO₄，通过抽吸进行混合。在真空条件下将样品上样至STAR工作台的吸附床上，随后用200 µL 20%甲醇水溶液进行清洗。在高真空条件下使吸附剂干燥。用含5%浓氨水溶液(28%~30%)的50:50乙腈:甲醇将样品洗脱两次，每次25 µL。所有样品均用150 µL 97:2:1水:乙腈:甲酸稀释，并在加热摇床中混合3分钟，然后取出进行LC-MS/MS分析。图2为工作流程的详细图示。上文详述的整个自动化SPE过程均提供有易于使用的脚本，可轻松应用于任何Hamilton Microlab STAR或STARlet配置。



- | | |
|--------------------|--------------------------------|
| 1. 50 μ L吸头架 | 7. Hamilton加热摇床(HHS) |
| 2. 300 μ L吸头架 | 8. 吸头储存位置 |
| 3. 1000 μ L吸头架 | 9. 真空萃取装置 |
| 4. 样品管架 | 10. MCX μ Elution SPE板放置支架 |
| 5. IS缓冲液试管架 | 11. 700 μ L圆孔收集板 |
| 6. MCX试剂储液瓶支架 | |

图1. Hamilton Microlab STAR与附件的布局图示



图2.包含内标添加、温育和整个SPE过程的工作流程

LC-MS/MS条件

LC system:	ACQUITY UPLC I-Class (FTN)
Detection:	Xevo TQ-S micro ESI+
Column:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 1.7 µm, 2.1 x 100 mm (p/n: 186002352)
Temp.:	40 °C
Sample temp.:	10 °C
Injection volume:	5 µL
Mobile phases:	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in acetonitrile
Purge solvent:	50% methanol in H ₂ O

Wash solvent:

25:25:25:25 MeOH:H₂O:IPA:ACN

梯度:

时间(min)	流速(mL/min)	%MPA	%MPB
0.00	0.6	98	2
3.33	0.6	33	67
3.50	0.6	10	90
3.60	0.6	98	2
4.00	0.6	98	2

MS条件

毛细管电压: 1.0 kV

脱溶剂气温度: 500 °C

锥孔气流速: 150 L/h

脱溶剂气流速: 1000 L/h

以下参数针对特定化合物进行了优化: 采集范围、锥孔电压、MRM通道和碰撞能量。这些参数可参见沃特世应用纪要720006187ZH <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134965859>> 的附录1。

数据管理

Hamilton控制软件：	Venus 3
仪器控制软件：	MassLynx 4.2版
定量软件：	TargetLynx

结果与讨论

定量分析

执行定量分析之前，先开展分析物回收实验，对手动平台与Hamilton Microlab STAR进行比较，证明经过验证的方法在自动化平台上具有稳定性。两个平台之间的回收率结果相当，因此认为使用自动化样品萃取方法与手动萃取一样有效。

分三天对三批混合尿样进行萃取。绘制两份七点校正曲线，并且重复六次萃取四种不同浓度的质量控制样品。对于大多数化合物，配制浓度为15、75、250和750 ng/mL的质量控制样品，其中较低浓度范围内化合物的浓度为3、15、50和150 ng/mL，较高浓度范围内化合物的浓度为37.5、187.5、625和1875 ng/mL。各化合物的校准范围可参见沃特世应用纪要720006187ZH <

<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134965859>> 的表1。各校准品的可接受标准均为目标值±15%，最低浓度点除外，其可接受标准为±20%。质量控制样品的可接受标准为15%范围内，浓度最低的QC样品除外，其可接受标准为目标值的20%范围内。这些标准符合SWGTOX指南⁷和FDA生物分析方法验证要求⁸。三批样品的日间结果总结参见附录1。所有化合物均符合上述标准，且大多数化合物的%RSD低于5%。批次3的日内结果总结参见附录2。所有化合物（除7-氨基氯硝西洋为117%、丁丙诺啡为131%且地西洋为116%以外）均符合标准，且大多数化合物的%RSD均低于5%。所有化合物的R²值均高于0.99。

对比分析

将每个批次中的各个样品萃取两次。每份校准品和质量控制样品均使用Hamilton Microlab STAR处理一份，同时手动处理一份。这样做的目的在于证明自动化平台在执行萃取操作方面的可靠性，其准确度和精密度均在可接受标准的预期范围内。图3展示了手动和自动样品前处理的三个批次中QC 2的结果。手动与自动样品萃取相比，利用STAR分析各化合物获得的准确度和%RSD与手动结果相当，甚至更出色。

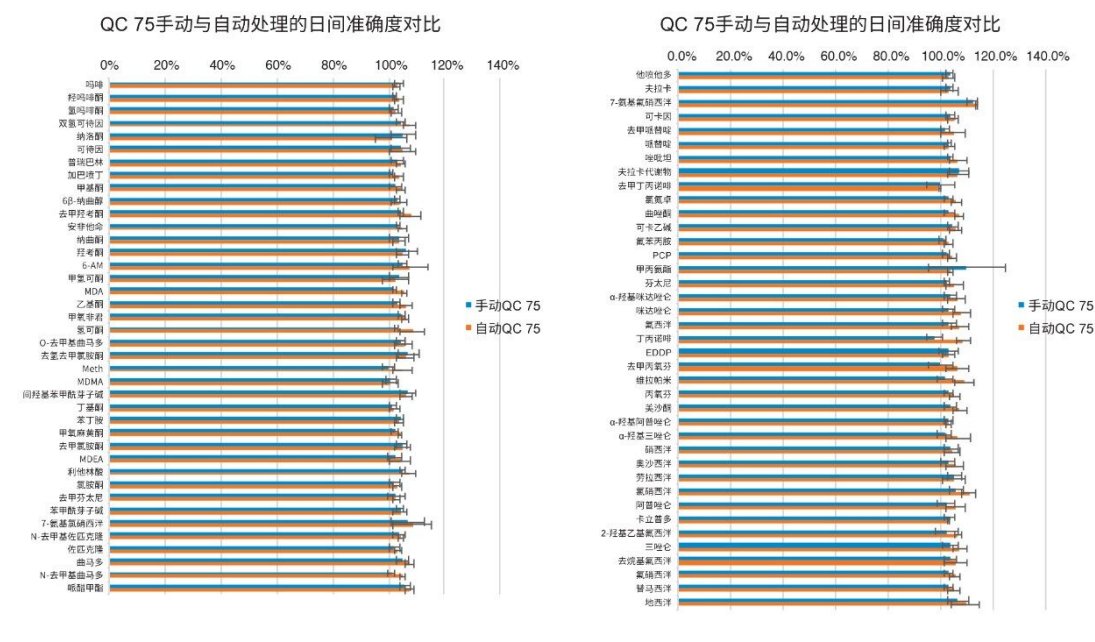


图3.手动和自动化平台之间QC2的准确度和误差%比较

结论

使用Hamilton Microlab STAR自动完成尿液中大量滥用药物和镇痛药物的预处理和后续萃取过程，是解决样品制备这一限速环节的有效方法。该解决方案为一系列综合性毒理学化合物组提供了一种简单、快速的SPE过程。将现成脚本与先前经过验证的SPE和分析方法相结合，能够使整个过程快速完成。该全自动样品前处理方法可提供稳定且可重现的定量性能， R^2 值高于0.99，所有化合物的QC准确度在85%~115%之间（低浓度QC为80%~120%），且大多数化合物的%RSD低于10%。大幅减少了与分析人员相关的错误（例如，分析人员不一致、样品转移、IS添加和标记错误）。使用简单而稳定的全自动样品前处理和SPE方案可实现准确的定量分析。

参考文献

1. Chapter 5 Automation Tools and Strategies for Bioanalysis, in Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis, David A. Wells, Editor 2003, Elsevier.p. 135-197.

2. Lehmann, S.; *et al.* Determination of 74 New Psychoactive Substances in Serum Using Automated In-line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.B.* 2017, *1064*, 124-138.
3. Wei, D.; *et al.* Online and Automated Sample Extraction. *Bioanalysis* 2015, *7* (17), 2227-2233.
4. Zheng, N.; Jiang, H.; Zeng, J. Current Advances and Strategies Towards Fully Automated Sample Preparation for Regulated LC-MS/MS Bioanalysis. *Bioanalysis* 2014, *6* (18), 2441-2459.
5. Ramírez Fernández, M.d.M.; *et al.*, Validation of an Automated Solid-Phase Extraction Method for the Analysis of 23 Opioids, Cocaine, and Metabolites in Urine with Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 2014, *38* (5), 280-288.
6. Danaceau, J. P.; Freeto, S. M.; Calton, L. J. A Comprehensive Method for the Analysis of Pain Management Drugs and Drugs of Abuse Incorporating Simplified, Rapid Mixed-Mode SPE with UPLC-MS/MS for Forensic Toxicology. Waters Application Note, [720006187EN <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134965859>](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134965859) , 2019.
7. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) – Recommendations of the Research, Development, Testing, and Evaluation Committee. *Journal of Analytical Toxicology* 2013, *37* (3), 187-191.
8. Bansal, S.; DeStefano, A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. *The AAPS Journal* 2007, *9* (1), E109-E114.

附录1

化合物名称	日间准确度											
	QC 15			QC 75			QC 250			QC 750		
	平均值	SD	%RSD	平均值	SD	%RSD	平均值	SD	%RSD	平均值	SD	%RSD
吗啡	102.9%	0.5%	0.5%	102.8%	1.2%	1.1%	102.2%	1.5%	1.4%	101.2%	1.5%	1.5%
羟吗啡酮	102.6%	1.5%	1.5%	103.6%	1.7%	1.6%	102.4%	0.6%	0.6%	102.8%	1.3%	1.3%
氢吗啡酮	101.7%	3.0%	2.9%	102.7%	1.7%	1.7%	101.1%	1.0%	1.0%	102.5%	0.2%	0.2%
双氢可待因	100.5%	5.6%	5.6%	107.7%	2.3%	2.1%	102.7%	2.8%	2.7%	101.2%	1.4%	1.4%
纳洛酮	103.7%	16.2%	15.6%	101.0%	5.6%	5.6%	97.7%	4.0%	4.1%	104.6%	8.4%	8.0%
可待因	100.7%	4.7%	4.7%	105.0%	4.9%	4.6%	100.6%	4.1%	4.0%	104.7%	3.4%	3.2%
普瑞巴林	99.1%	7.2%	7.3%	104.2%	1.6%	1.5%	103.4%	0.4%	0.3%	102.6%	4.3%	4.2%
加巴喷丁	101.9%	2.4%	2.4%	103.6%	1.5%	1.4%	101.9%	2.2%	2.1%	102.1%	1.3%	1.3%
甲基酮	103.1%	2.1%	2.1%	104.5%	1.5%	1.5%	102.7%	1.8%	1.8%	101.2%	1.3%	1.3%
6β-纳曲酮	100.9%	2.3%	2.3%	103.7%	3.1%	3.0%	99.9%	3.0%	3.0%	100.9%	1.7%	1.7%
去甲羟考酮	105.2%	7.4%	7.0%	107.8%	3.9%	3.6%	101.7%	2.6%	2.5%	99.0%	0.6%	0.6%
安非他命	101.0%	2.1%	2.1%	105.1%	1.7%	1.6%	102.8%	3.3%	3.2%	100.2%	0.8%	0.8%
纳曲酮	99.6%	7.1%	7.2%	103.7%	2.2%	2.1%	98.4%	2.5%	2.6%	100.3%	1.5%	1.5%
羟考酮	103.5%	2.6%	2.5%	105.0%	2.3%	2.2%	100.1%	2.3%	2.3%	97.3%	0.9%	0.9%
6-AM	103.0%	2.6%	2.5%	107.6%	6.6%	6.1%	104.8%	5.5%	5.3%	103.4%	1.2%	1.2%
甲氢可酮	100.3%	6.0%	5.9%	102.3%	4.8%	4.7%	102.0%	3.8%	3.7%	103.2%	6.4%	6.3%
MDA	100.3%	6.5%	6.5%	105.6%	1.0%	0.9%	102.9%	2.0%	2.0%	101.3%	1.4%	1.4%
乙基酮	101.6%	1.1%	1.1%	106.0%	2.4%	2.2%	103.2%	2.2%	2.1%	102.0%	0.8%	0.8%
甲氧非酮	102.4%	3.1%	3.0%	105.9%	1.2%	1.2%	102.3%	0.3%	0.3%	102.1%	1.9%	1.9%
氢可酮	104.3%	1.5%	1.4%	108.6%	4.8%	4.4%	104.1%	3.0%	2.9%	102.7%	2.6%	2.6%
O-去甲基曲马多	103.4%	2.8%	2.7%	105.3%	3.0%	2.9%	101.9%	2.2%	2.2%	100.9%	1.3%	1.3%
去氧去甲氢酮	103.4%	2.0%	1.9%	106.0%	3.3%	3.1%	102.4%	2.9%	2.8%	101.8%	1.0%	1.0%
Meth	100.9%	2.4%	2.4%	105.2%	3.7%	3.5%	103.2%	5.6%	5.4%	99.8%	3.6%	3.6%
MDMA	101.8%	4.5%	4.4%	100.5%	3.0%	3.0%	101.1%	4.5%	4.5%	102.4%	3.3%	3.2%
间羟基苯甲酰芽子碱	100.2%	2.0%	2.0%	106.3%	2.4%	2.2%	100.8%	1.1%	1.1%	101.0%	1.2%	1.1%
丁基酮	103.6%	1.9%	1.8%	102.1%	2.1%	2.1%	101.1%	1.9%	1.9%	102.8%	1.5%	1.5%
苯丁胺	99.9%	1.6%	1.6%	103.7%	1.6%	1.5%	101.5%	2.2%	2.1%	101.0%	4.2%	4.1%
甲氧麻黄碱	102.8%	3.0%	2.9%	104.1%	0.6%	0.6%	102.7%	1.3%	1.3%	103.1%	1.7%	1.6%
去甲氢酮	101.1%	2.9%	2.8%	105.1%	2.8%	2.7%	102.6%	2.5%	2.4%	102.1%	1.7%	1.7%
MDEA	103.1%	2.3%	2.2%	104.2%	3.7%	3.6%	101.4%	4.5%	4.4%	101.7%	3.5%	3.4%
利他林酸	101.5%	0.9%	0.9%	107.4%	2.7%	2.5%	102.8%	2.2%	2.2%	100.5%	2.6%	2.6%
氢酮	102.6%	1.2%	1.2%	103.2%	1.6%	1.6%	101.7%	1.1%	1.0%	102.5%	1.8%	1.8%
去甲芬太尼	100.7%	3.2%	3.2%	102.7%	1.3%	1.3%	101.1%	2.7%	2.7%	102.8%	2.6%	2.5%
苯甲酰芽子碱	102.9%	1.2%	1.2%	104.1%	2.8%	2.7%	101.6%	2.1%	2.1%	102.1%	0.9%	0.9%
7-氨基氯西汀	99.0%	2.1%	2.1%	108.6%	7.4%	6.8%	103.4%	2.4%	2.3%	98.1%	3.0%	3.1%
N-去甲基佐匹克隆	105.7%	3.6%	3.4%	104.4%	1.0%	1.0%	102.7%	1.6%	1.5%	104.3%	5.2%	5.0%
佐匹克隆	104.0%	2.4%	2.3%	103.3%	1.3%	1.3%	100.2%	0.9%	0.9%	102.4%	0.2%	0.2%
曲马多	101.6%	1.6%	1.5%	107.3%	1.6%	1.5%	102.5%	2.1%	2.0%	100.5%	2.8%	2.8%
N-去甲基曲马多	102.8%	2.1%	2.1%	105.0%	1.0%	0.9%	103.3%	2.0%	1.9%	101.3%	1.7%	1.7%
哌替啶	103.4%	1.8%	1.7%	107.5%	1.6%	1.5%	102.3%	2.5%	2.5%	96.4%	2.1%	2.2%
他喷他多	102.6%	0.7%	0.7%	103.1%	2.7%	2.6%	102.2%	2.0%	1.9%	102.3%	1.0%	1.0%
夫拉卡	102.4%	1.2%	1.1%	103.5%	3.6%	3.5%	102.5%	3.0%	2.9%	102.1%	0.2%	0.2%
7-氨基氯西汀	103.1%	6.5%	6.3%	114.2%	0.4%	0.3%	100.8%	2.6%	2.6%	95.0%	2.6%	2.7%
可卡因	102.3%	1.1%	1.1%	105.0%	2.1%	2.0%	102.4%	2.3%	2.2%	102.0%	1.6%	1.5%
去甲羟替啶	104.1%	1.8%	1.8%	105.2%	5.0%	4.7%	103.1%	3.7%	3.6%	103.4%	3.0%	2.9%
哌替啶	102.8%	1.8%	1.8%	103.5%	1.9%	1.8%	101.6%	1.6%	1.6%	102.2%	0.7%	0.7%
唑吡坦	105.8%	2.6%	2.5%	106.7%	3.6%	3.4%	104.6%	2.9%	2.7%	103.9%	2.3%	2.2%
夫拉卡代谢物	109.6%	3.9%	3.5%	106.7%	4.2%	3.9%	104.9%	3.7%	3.5%	108.2%	3.1%	2.9%
去甲丁丙诺啡	102.2%	20.0%	19.6%	99.4%	0.2%	0.2%	102.4%	6.2%	6.0%	106.5%	2.2%	2.1%
氯氮卓	104.8%	1.2%	1.1%	106.0%	2.1%	2.0%	104.1%	3.3%	3.2%	104.1%	2.7%	2.6%
曲唑酮	111.1%	6.8%	6.1%	107.2%	2.0%	1.9%	105.9%	3.0%	2.8%	106.4%	2.3%	2.2%
可卡乙碱	102.1%	1.1%	1.0%	105.8%	2.4%	2.3%	102.0%	1.2%	1.2%	102.2%	1.7%	1.6%
氟苯丙胺	103.4%	2.0%	1.9%	103.4%	1.8%	1.7%	102.2%	1.8%	1.8%	102.7%	1.3%	1.3%
PCP	102.6%	2.1%	2.1%	104.4%	1.8%	1.7%	102.5%	2.0%	1.9%	101.0%	1.4%	1.4%
甲丙氨酯	103.5%	3.0%	2.9%	104.0%	0.9%	0.9%	98.2%	2.0%	2.7%	106.4%	1.7%	1.6%
芬太尼	107.0%	3.5%	3.3%	105.4%	3.7%	3.5%	103.3%	1.9%	1.9%	104.5%	2.2%	2.1%
α-羟基哌唑啉	110.3%	3.3%	3.0%	106.3%	3.6%	3.4%	104.1%	1.6%	1.5%	103.1%	2.1%	2.1%
咪达唑仑	111.9%	4.6%	4.1%	108.1%	3.7%	3.4%	106.8%	3.2%	3.0%	106.3%	3.5%	3.3%
氟西汀	109.0%	4.1%	3.8%	107.3%	3.7%	3.4%	108.3%	3.9%	3.6%	105.8%	1.7%	1.6%
丁丙诺啡	120.7%	10.6%	8.7%	108.8%	2.8%	2.5%	106.8%	0.7%	0.7%	109.7%	2.4%	2.2%
EDDP	104.1%	1.3%	1.2%	103.3%	2.3%	2.3%	103.0%	3.3%	3.2%	101.8%	1.8%	1.8%
去甲丙氧芬	107.2%	4.0%	3.7%	106.6%	4.8%	4.5%	103.7%	4.0%	3.8%	102.5%	5.0%	4.9%
维拉帕米	117.5%	4.8%	4.1%	109.5%	4.0%	3.7%	111.2%	2.6%	2.4%	109.6%	2.4%	2.2%
丙氧芬	110.1%	3.0%	2.7%	105.3%	2.1%	2.0%	104.8%	1.6%	1.5%	105.2%	2.4%	2.3%
美沙酮	112.5%	3.6%	3.2%	107.3%	2.9%	2.7%	107.1%	2.6%	2.4%	105.3%	2.8%	2.6%
α-羟基阿普唑仑	106.1%	7.5%	7.1%	103.3%	0.9%	0.9%	103.2%	2.8%	2.7%	103.6%	6.0%	5.8%
α-羟基三唑仑	105.5%	4.5%	4.3%	106.6%	5.0%	4.7%	105.2%	2.4%	2.3%	102.3%	2.4%	2.4%
硝西汀	106.1%	0.7%	0.6%	104.3%	3.1%	3.0%	102.3%	1.7%	1.6%	104.3%	2.7%	2.6%
奥沙西汀	101.6%	5.9%	5.8%	105.8%	3.6%	3.4%	104.3%	2.5%	2.4%	102.5%	3.5%	3.5%
劳拉西汀	102.7%	4.5%	4.4%	105.1%	4.5%	4.3%	103.5%	3.2%	3.1%	103.4%	1.6%	1.5%
氟硝西汀	107.1%	3.7%	3.4%	111.1%	3.0%	2.7%	105.8%	3.6%	3.4%	104.4%	2.4%	2.3%
阿普唑仑	103.0%	4.8%	4.7%	105.9%	3.6%	3.4%	101.7%	2.8%	2.7%	100.8%	2.2%	2.2%
卡立普多	101.3%	3.6%	3.5%	102.9%	0.4%	0.4%	102.1%	0.7%	0.6%	102.7%	1.2%	1.1%
2-羟基乙基氯西汀	105.6%	5.0%	4.7%	106.9%	1.2%	1.1%	104.4%	1.8%	1.7%	104.0%	2.6%	2.5%
三唑仑	105.1%	2.8%	2.6%	107.5%	3.0%	2.8%	105.3%	1.6%	1.6%	105.6%	1.0%	0.9%
去氧基氯西汀	107.0%	3.9%	3.6%	105.7%	4.4%	4.2%	103.5%	3.5%	3.4%	102.6%	1.4%	1.3%
氟硝西汀	103.3%	2.0%	2.0%	105.6%	2.3%	2.1%	102.8%	1.8%	1.8%	102.4%	1.8%	1.8%
替马西汀	104.3%	1.8%	1.7%	105.1%	2.6%	2.4%	103.7%	2.7%	2.6%	103.2%	1.6%	1.6%
地西汀	106.8%	2.1%	2.0%	109.7%	6.0%	5.4%	104.4%	2.7%	2.5%	104.3%	0.7%	0.7%

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.