

应用纪要

使用Andrew+移液机器人实现自动化高通量样品制备，进行人尿液中EtG和EtS的UPLC-MS/MS定量分析

Sarah Dunne, Danielle Cullen

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

仅适用于法医毒理学应用。

您想进一步了解Andrew+移液机器人吗？

申请产品演示

摘要

本研究使用Andrew Alliance的Andrew+移液机器人展示了一种简单的自动化“稀释-上样”样品制备方法。Andrew+开发的样品制备方法可用于制备生物标志物乙基葡萄糖醛酸苷(EtG)和硫酸乙酯(EtS)。在实验过程的每个

方案步骤中，Andrew+都会执行OneLab指令，对要使用的实验室器皿和蓝牙移液器设置必需参数。OneLab使用非常方便，可以直接创建和转换方法。

在ACQUITY UPLC I-Class (FTN)系统和Xevo TQD质谱仪上使用ACQUITY UPLC CSH苯己基柱（部件号：[186005408 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186005408-acquity-uplc-csh-phenyl-hexyl-column-130a-17--m-21-mm-x-150-mm-1.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186005408-acquity-uplc-csh-phenyl-hexyl-column-130a-17--m-21-mm-x-150-mm-1.html)）进行样品鉴定和定量分析。

优势

- 采用简单的“稀释-上样”样品制备方法
- 轻松转换自动化方法 – 获得与手动制备方法相媲美的结果
- 采用96孔板，大幅提升通量
- 提高效率 – 自动化移液操作使分析人员能更有效地利用时间
- 减少人为错误的机会
- OneLab软件可用于轻松创建/修改方法

简介

乙基葡萄糖醛酸苷(EtG)和硫酸乙酯(EtS)是监测酒精摄入的重要生物标志物。许多分析检测都将EtG和EtS作为生物标志物，用于鉴定并定量酒精摄入情况。事实证明，检测这些代谢物非常有用，酗酒现象在许多文化中非常普遍，对全球健康构成严重负担并引发一系列社会问题。因此，检测和鉴定酒精摄入的需求日益增长。

EtG和EtS的检测窗口期较长，因此是监测酒精摄入的理想标志物。EtG和EtS是乙醇的II相代谢物，微溶于水，在饮酒后最长80小时内可在尿液中检出¹。

本文所述的样品制备方法基于“稀释-上样”形式，即先用内标稀释样品，然后进样至LC-MS。

Andrew+上的EtG/EtS“稀释-上样”方法涉及在工作台上开发准确移取和混合样品的流程。此工作流程简单直接，但移液仍然是一项繁琐的重复性操作，在运行大量样品分析时尤其如此。该工作流程实现自动化使分析人员能够把专业技能更多地分配在其他工作上，并大幅减少培训要求。采用必备材料和平台设置运行方案时，OneLab云端软件可为用户提供指导。Andrew+为每次移液提供了可重现且一致的结果，从而降低手动样品制备方法中可能发生的用户出错风险。

实验

在Andrew+上开发两个脚本，对人尿液中的EtG和EtS进行自动化“稀释-上样”样品制备。

自动化制备 - Andrew+移液器混合



- 在7200 rpm下离心3 min后，将50 μ L等分试样加入2 mL 96孔收集板（部件号：186002482）中
- 将样品用500 μ L内标溶液稀释，然后用移液器混合
- 最后，提示用户密封样品，并将样品从Andrew+中取出

自动化制备 - Andrew+ Microplate Shaker+



- 在7200 rpm下离心3 min后，将50 μ L等分试样加入2 mL 96孔收集板（部件号：186002482）中
- 将样品用500 μ L内标溶液稀释，然后在摇床上以1700 rpm的转速混合2 min
- 最后，提示用户密封样品，并将样品从Andrew+中取出

结果与讨论

在Andrew+上针对“稀释-上样”自动化方法开发出两种方案。这两种自动化方案都将一组包含八个低浓度质控等分试样和八个高浓度质控等分试样的样品转移至2 mL收集板（部件号：[186002482 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/vials-containers--collection-plates/186002482-96-well-sample-collection-plate-2-ml-square-well-50-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/vials-containers--collection-plates/186002482-96-well-sample-collection-plate-2-ml-square-well-50-pk.html)）的前两行中，然后用水（代替内标）进行稀释。二者的区别在于孔内液体的混合方式。其中一种自动化方法使用移液器混合，另一种自动化方法使用Microplate Shaker+进行混合。调整移液器的液体处理参数，确保平稳移取样品。在采用移液器混合样品的方案开发期间调整

移液器混合参数。例如，提高移液器混合速度确保充分混合。使用OneLab可以简单直接地调整这些参数。这种优化有助于提高重现性和精密度。

针对两种脚本的Andrew+工作台完整布局如图1和图2所示。

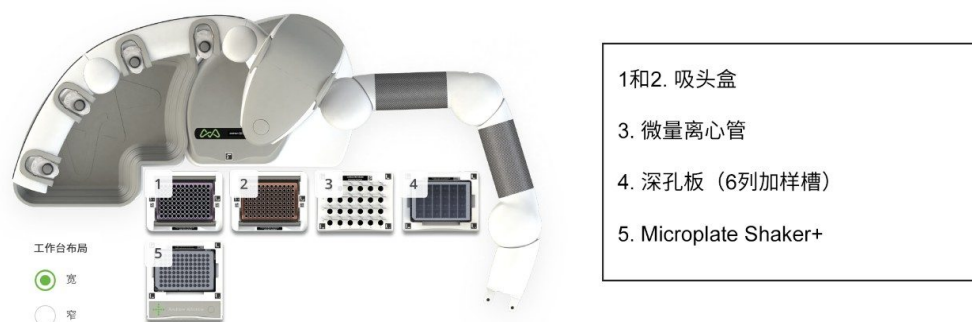


图1.使用Andrew+ Microplate Shaker+对人尿液中的EtG和EtS进行样品制备的Andrew+工作台布局



图2.使用Andrew+移液器混合方案对人尿液中的EtG和EtS进行样品制备的Andrew+工作台布局

本研究还执行了手动样品制备，以比较自动化工作流程与手动工作流程的回收率和精密度。

完成样品制备后，按照沃特世应用纪要720006273ZH <

<https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2018/720006273/720006273-en.pdf>> 中所述，使用之前指定的通道进行多重反应监测(MRM)。EtG使用两个通道，EtS使用一个通道。对于EtG，采用

EtG/EtS质控浓度为500/250 ng/mL时的目标定量/定性离子比率。

图3为自动化进样的示意图。所示结果与沃特世应用纪要720006273ZH <

<https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2018/720006273/720006273-en.pdf>> 中获得的结果相当。可接受标准为目标离子比率±20%。

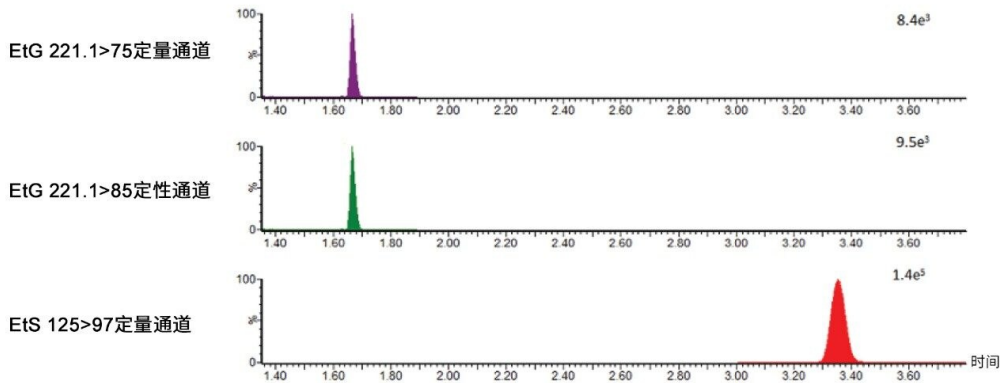


图3.EtG: 500 ng/mL (0.5 mg/mL), EtS: 200 ng/mL (0.20 mg/mL)

采用两种浓度的EtG (200 ng/mL和500 ng/mL) 和EtS (800 ng/mL和2000 ng/mL) 评估所有方法的精密度。

“稀释-上样”自动化分析的精密性与手动制备工作流程相当。对于EtS, 精密度略有改善。精密度结果见表1。

表1. 精密度数据

精密度(%CV) (n = 8)			
化合物	手动制备方法	Andrew+ Microplate Shaker+	Andrew+ 移液器混合
EtG 500 ng/mL	3.4	3.4	3.3
EtG 2000 ng/mL	1.5	1.7	2.0
EtS 200 ng/mL	3.6	1.4	1.9
EtS 800 ng/mL	2.7	1.2	1.7

Andrew+自动化工作流程与手动工作流程的回收率比较可参见图4。对于EtG和EtS的低浓度和高浓度QC样品, 获得的总体回收率结果(n = 8)与手动工作流程相差±2%。

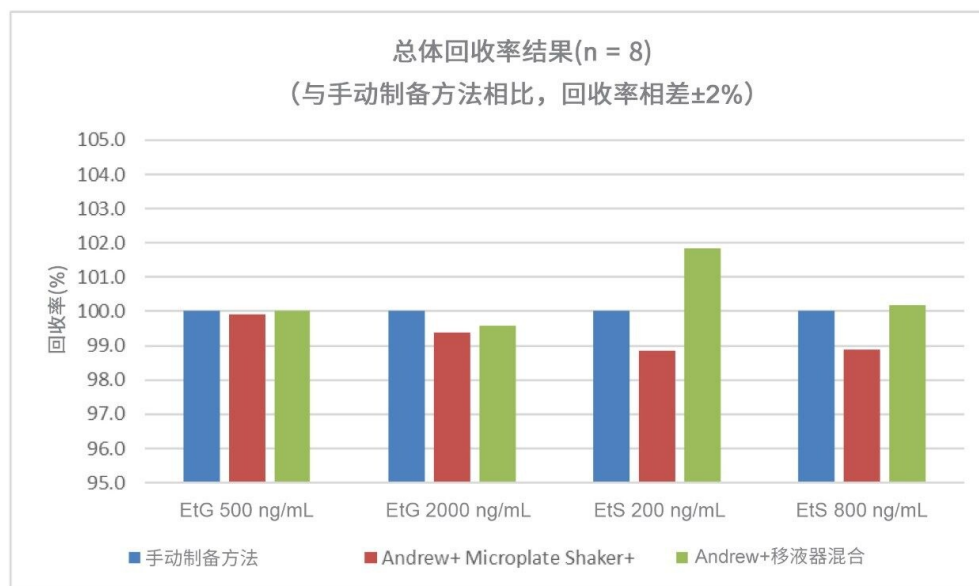


图4.Andrew+样品制备方法的回收率

在Andrew+上开发出的两种自动化方法均表现出与手动制备工作流程非常相似且等效的性能。客户可以选用其中任一种自动化方法定量分析人尿液中的EtG和EtS。在采用高通量设置的工作流程中, 与移液器混合相比, 选择Microplate Shaker+有助于提高效率。

有关所用材料和LC-MS/MS方法的更多信息, 请参见方案720006273ZH <
<https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2018/720006273/720006273-en.pdf>>。

结论

本文展示了在高通量设置中使用Andrew+移液机器人对EtG和EtS进行“稀释-上样”样品制备的自动化方法。Andrew+已证明, 可以利用Andrew+移液器混合或Microplate Shaker+进行样品混合。

所开发的方法在生物标志物EtG和EtS的鉴定和定量分析中具有出色的准确度、精密度, 并且可与手动制备方法相媲美。

参考资料

1. Ohouo, P. Y.; Dixon, N.; Lieu, A.; Zavery, Z.; Rosano, T. G. 使用UPLC-MS/MS方法定量人尿液中的EtG和EtS.沃特世应用纪要, 720006273ZH <<https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2018/720006273/720006273-en.pdf>> , 2018年5月.

特色产品

Xevo TQD三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134608730>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

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

ACQUITY UPLC和ACQUITY PREMIER色谱柱 <<https://www.waters.com/513206>>

720007186ZH, 2021年3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