

使用Extraction+互联装置搭配Andrew+™移液机器人进行全自动生物分析固相萃取样品前处理

Jonathan P. Danaceau, Mary Trudeau

Waters Corporation

摘要

以下内容介绍Andrew+移液机器人搭配Extraction+互联装置结合小柱和SPE 96孔板，对血浆中的各种药品进行全自动生物分析固相萃取(SPE)以及后续LC-MS检测和分析的能力。

优势

- 使用Andrew+移液机器人和Extraction+互联装置自动绘制校正曲线、生成QC样品和进行固相萃取
 - 使用操作简便且可直观查看数据OneLab™软件创建和传输方法
 - 自动化功能与SPE板和小柱兼容
 - Extraction+互联装置的真空压力曲线完全可设定，可减少萃取性能的差异性
 - 自动化移液和样品前处理可以提高效率，让用户有时间执行其他任务
 - 完全“无人值守”自动化，没有用户干预步骤，降低手动失误风险
-

简介

样品前处理的目的是将目标分析物从基质中分离出来并尽可能地去掉干扰物，是生物分析工作流程中相当重要的一环（图1）。为了获得准确、精密且可重现的结果，通常需要一名技术娴熟且富有经验的分析人员，因为在执行样品前处理方案时需要尽可能地减少任何错误或不一致，以避免它们在整个流程中传播。这些错误或不一致可能引起定量不准确，并且可能因重新提取失控批次而导致潜在的时间和资源损失。它们包括生成校正曲线和质量控制(QC)样品时的移液错误、样品漏标或错标、试剂添加错误、分析人员技术相关的不一致和其他可能影响结果的变量。

在生物分析实验室中引入自动化有助于尽可能减少或消除一些错误或不一致，还可以让生物分析科学家有时间执行其他任务。尽管生物分析工作流程的其他环节（如仪器分析、自动采样、数据和结果管理等）在自动化方面有所进展，但由于开发可靠的自动化方案通常需要时间和自动化专业知识，样品前处理往往仍需手动完成。

本应用利用Andrew+移液机器人对血浆中的多种小分子药物生成校正曲线和QC样品。然后再用Andrew+移液机器人(Andrew+)和新型Extraction+互联装置(Extraction+)对制得的样品进行固相萃取(SPE)。Extraction+是一款全新的全自动SPE系统解决方案，与Andrew+搭配使用。Extraction+由一个带“垫圈升降器”和“停放点”（空闲位置）的真空萃取装置、一个可控的真空泵和一个位于装置底座并与外部废液瓶（GL45螺口瓶）相连的废液收集器组成，提供小柱和96孔板规格的完全“无人值守”SPE样品前处理。使用该SPE系统解决方案生成校正曲线和QC样品以及从血浆中萃取分析物可以提供优异的准确度和精密度。所得校正曲线具有优良的精密度(RSD \pm 15%)和线性(>0.99)，质量控制准确度为95.8-107.5%，低、中和高浓度QC的RSD \leq 5.0%。这些结果完全符合FDA对于小分子LC-MS生物分析性能的建议值。



图1.使用Oasis HLB SPE板和小柱以及Andrew+移液机器人搭配Extraction+互联装置进行的全自动SPE样品萃取和LC-MS分析流程图示。

实验

材料

所有目标药物均购自Sigma Aldrich <<http://www.sigmaaldrich.com>>。用甲醇制备每种分析物的储备液(1 mg/mL)。用甲醇制备10 mL全部分析物的储备液(100 µg/mL)。大鼠血浆(K₃EDTA)购自Innovative Research <<http://www.innov-research.com>>。用血浆制备日常工作溶液，用于生成校正曲线和QC样品。对于使用小柱的方案，制备两份校正品，浓度范围5-200 ng/mL。制备QC血浆样品一式三份，浓度分别为10（低浓度QC）、50（中浓度QC）和150（高浓度QC）ng/mL。对于使用96孔SPE板的方案，制备两份校正品，浓度范围5-500 ng/mL。制备QC血浆样品一式三份，浓度分别为20（低浓度QC）、50（中浓度QC）和400（高浓度QC）ng/mL。LC-MS级甲酸和磷酸购自Sigma Aldrich。

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。

SPE萃取

萃取方案

使用Oasis HLB 30 mg萃取板(P/N: WAT058951 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/wat058951-oasis-hlb-96-well-plate-30-mg-sorbent-per-well-30--m-1-pk.html>>)或Oasis HLB 1 cc小柱(P/N: 186001879 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/186001879-oasis-hlb-1-cc-flangeless-vac-cartridge-30-mg-sorbent-per-cartri.html>>)执行同一反相(RP) SPE萃取方法。上样步骤使用1.0 mL用4%磷酸水溶液1:1稀释的血浆（0.5 mL未稀释血浆）。然后用1 mL 95:5水:甲醇清洗样品，再用2 x 250 µL 100%甲醇洗脱样品，最后用500 µL水稀释。

这些使用生物分析萃取板和小柱进行SPE样品前处理的四个OneLab方案和图示说明见图2-9。每种规格采用一种样品前处理和稀释方案，然后由Andrew+搭配Extraction+执行单独的SPE萃取方案。

方案1 - 使用HLB 30 mg板萃取方案制备校正曲线样品和QC样品 – 方案图示



图2. OneLab方法使用的仪器列表和样品稀释方案图示如上。移液枪、移液枪吸头、Domino和所需实验器皿见右图

o

方案1 - 使用HLB 30 mg板萃取方案制备校正曲线样品和QC样品 - Andrew+工作台布局

← Bench preparation

Deck layout Wide
 Narrow



位置 | 组件布局

1-2 吸头盒*Domino*

3 储存板*Domino*

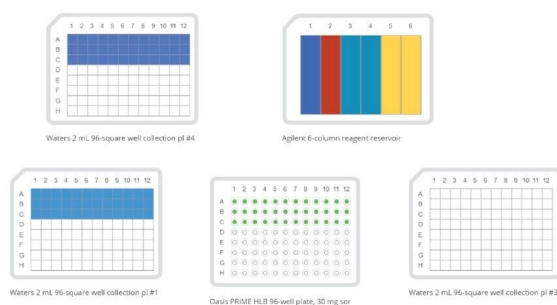
4 微量离心管*Domino*

5 深孔微孔板*Domino*

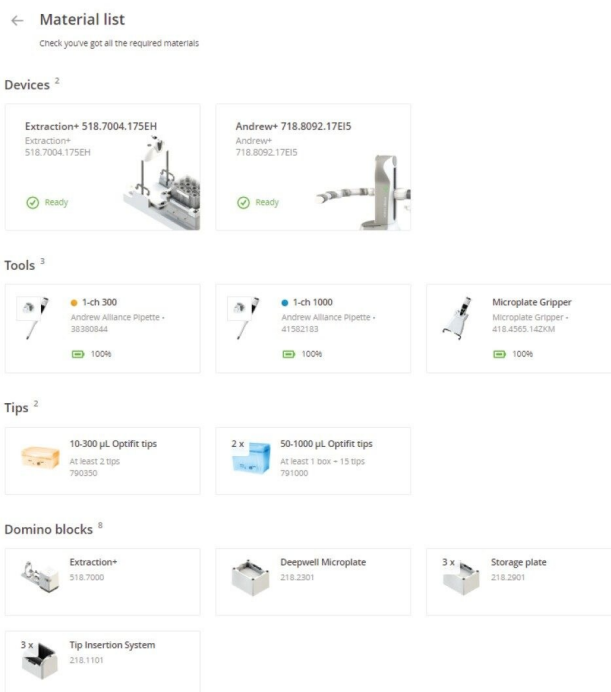
图3.Andrew+样品稀释工作台布局如上，展示了所有组件的摆放位置。图下方列出了所需的*Domino*。

方案2 – Oasis HLB 30 mg板萃取 – 方案图示

OneLab方案图示



Andrew+系统组件： Domino、电子移液枪和吸头



其他消耗品

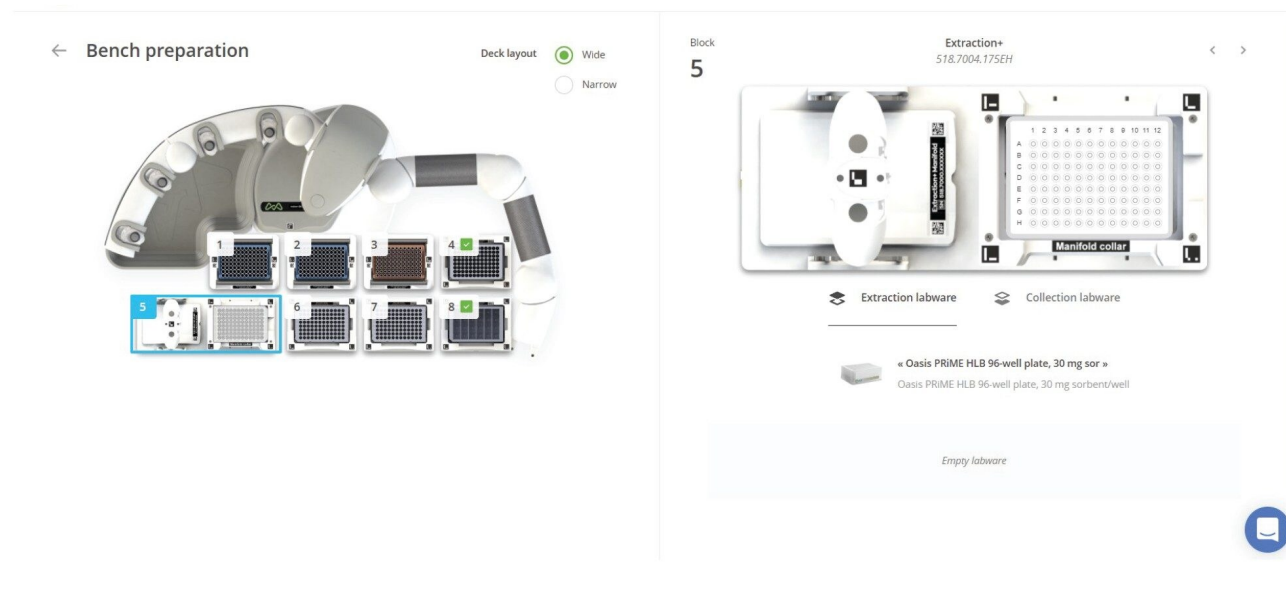
Waters Oasis HLB 96孔板, 30 mg吸附剂/孔 | P/N: WAT058951

沃特世2 mL方孔收集板 | P/N: 1860002482

Agilent六通色谱柱溶剂瓶 | P/N: 201-284-100

图4. OneLab方法使用的仪器列表和板萃取方案 (SPE方案) 图示如上。移液枪、移液枪吸头、Domino和所需实验器皿见右图。

方案2 – Oasis HLB 30 mg板萃取 – Andrew+工作台布局



位置 | 组件布局

1-3 吸头盒*Domino*

4 深孔微孔板*Domino*

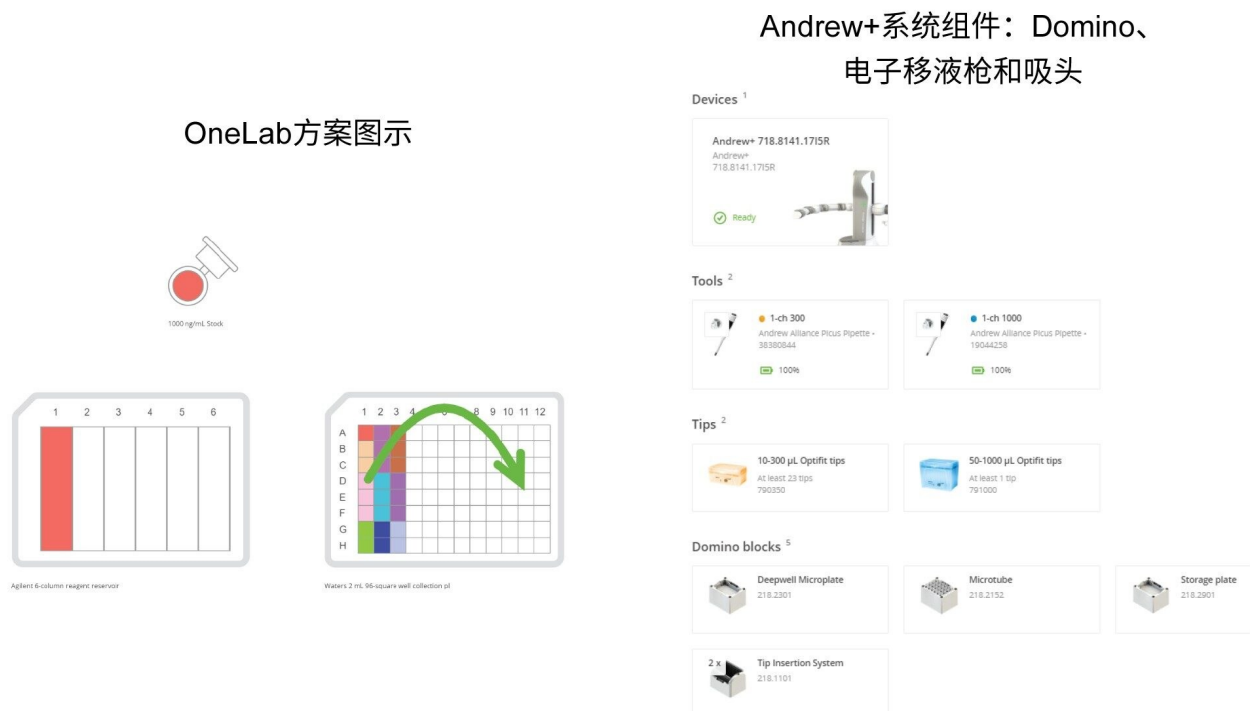
5 *Extraction+* 互联装置

6-7 储存板*Domino*

8 深孔微孔板*Domino*

图5. *OneLab*板萃取方案（SPE方案）的工作台布局如上，展示了所有组件的摆放位置。图下方列出了所需的*Domino*和设备。

方案3 - 制备校正曲线样品和QC样品 | 1 cc小柱萃取 – 方案图示



其他消耗品

Eppendorf 2 mL Safe-Lock管 | P/N: 0030120094

沃特世2 mL方孔收集板 | P/N: 1860002482

Agilent六通色谱柱溶剂瓶 | P/N: 201-284-100

图6. OneLab方法使用的仪器列表和样品稀释方案图示如上。移液枪、移液枪吸头、Domino和所需实验器皿见右图。

方案3 - 制备校正曲线样品和QC样品 | Oasis HLB 1 cc小柱萃取 | Andrew+工作台布局

← Bench preparation

Deck layout Wide Narrow



位置 | 组件布局

1-2 吸头盒*Domino*

3 储存板*Domino*

4 微量离心管*Domino*

5 深孔微孔板*Domino*

图7. *OneLab*样品稀释方案工作台布局如上，展示了所有组件的摆放位置。图下方列出了所需的*Domino*。

方案4 – Oasis HLB 1 cc Vac小柱萃取 – 方案图示



← Material list
Check you've got all the required materials

Devices ²

Extraction+ 518.7004.175EH
Extraction+
518.7004.175EH

Ready

Andrew+ 718.8092.17EIS
Andrew+
718.8092.17EIS

Ready

Tools ⁴

1-ch 300
Andrew Alliance Pipette -
38380844

100%

1-ch 1000
Andrew Alliance Pipette -
41582183

100%

8-ch 1200
Andrew Alliance Pipette -
41680944

100%

Microplate Gripper
Microplate Gripper -
418.4565.14ZDM

100%

Tips ³

10-300 µL Optifit tips
At least: 2 tips
790350

50-1000 µL Optifit tips
At least: 12 tips
791000

50-1200 µL Optifit tips
At least: 48 tips
791210

Domino blocks ⁸

Extraction+
518.7000

Deepwell Microplate
218.2301

2 x Storage plate
218.2001

Collection Labware Rack
218.4611

3 x Tip Insertion System
218.1101

其他消耗品

Waters Oasis HLB 1 cc Vac小柱, 30 mg吸附剂 | P/N: WAT094225

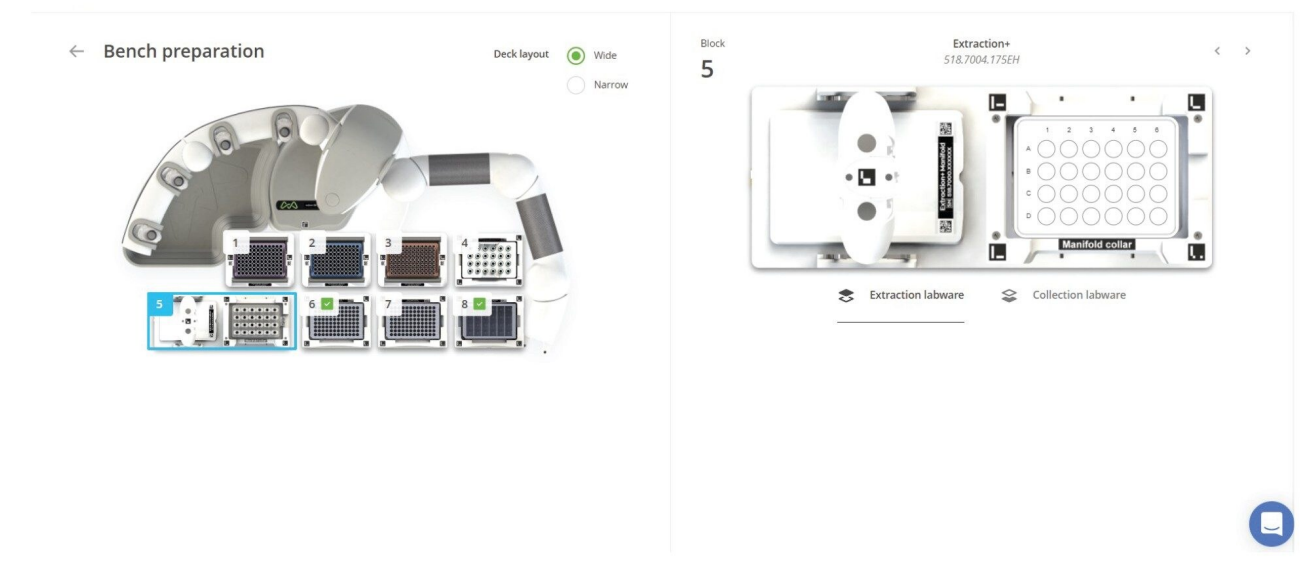
沃特世2 mL方孔收集板 | P/N: 1860002482

Agilent六通色谱柱溶剂瓶 | P/N: 201-284-100

TruView LCMS认证12 x 32 mm透明玻璃最大回收样品瓶 | P/N: 186005662CV

图8.OneLab方法使用的仪器列表和小柱萃取方案 (SPE方案) 图示如上。移液枪、移液枪吸头、Domino和所需实验器皿见右图。

方案4 – Oasis HLB 1 cc Vac小柱萃取，使用Extraction+互联装置 – Andrew+工作台布局



位置 | 组件布局

1-3 吸头盒*Domino*

4 收集器皿架*Domino*

5 *Extraction+*互联装置

6-7 储存板*Domino*

8 深孔微孔板*Domino*

图9. *OneLab*小柱萃取方案（*SPE*方案）的工作台布局如上，展示了所有组件的摆放位置。图下方列出了所需的*Domino*和设备。

色谱和MS/MS条件

液相色谱条件

液相色谱系统:

ACQUITY UPLC I-Class

流动相A:	0.1%甲酸的100% MilliQ水溶液
流动相B:	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)
检测条件:	Xevo TQ-XS质谱仪
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS PFP色谱柱, 1.8 μ m, 2.1 mm x 50 mm (P/N: 186005965)
柱温:	35 $^{\circ}$ C
样品温度:	10 $^{\circ}$ C
进样体积:	5 μ L
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	100	0	6
5.0	0.5	5.0	95.0	6
6.0	0.5	5.0	95.0	6
6.1	0.5	100	0	6
7.0	0.5	100	0	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:	60 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™

	M+H ⁺ 母离子	碎片离子 (一级)	碰撞能量 (一级)	碎片离子 (二级)	碰撞能量 (二级)
乙酰唑胺	221.1	79.0	20	83.0	16
对乙酰氨基酚	452.1	65.0	24	110.1	14
强的松	359.2	313.1	12	147.1	28
2-甲基苯甲酰胺	136.2	77.1	18	44.1	16
可的松	361.2	163.0	22	121.1	26
美托洛尔	268.2	116.1	18	98.1	18
阿米替林	278.2	105.0	22	91.0	28

表1.用于评估Andrew+移液机器人搭配Extraction+的SPE性能的小分子分析物，以及各自用于MS分析的MRM母离子和碎片离子。

LC-MS分析

色谱分离采用Waters ACQUITY UPLC I-Class和ACQUITY UPLC HSS PFP色谱柱(1.8 μm , 2.1 x 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 $^{\circ}\text{C}$ 。使用Waters Xevo TQ-XS质谱仪(ESI+)通过单个分析物的多重反应监测(MRM)检测药物分析物。MS检测中对每个分析物选择两个MRM通道（定量通道和确认通道）。表2中列出了每种药物的MS条件。

结果与讨论

Extraction+是一种新的全自动SPE系统解决方案，与Andrew+搭配使用，在SPE样品前处理和萃取过程中无需用户干预（图10）。Extraction+互联装置由两个模块组成：精心设计的SPE萃取装置和真空泵，两者都由OneLab软件控制。当搭配Andrew+移液机器人使用时，该装置可以进行液体处理和样品提取，实现完全无人值守的样品前处理。Andrew+移液机器人搭配Extraction+互联装置的主要特点包括：同时兼容萃取板和小柱、流通式废液收集、方案的完全真空控制，最重要的是实现了完全无人值守的自动化。流通式废液收集无需放置和移除废液收集器皿。一体化垫圈升降器将多联器垫圈移动到多联器底座上或从中移出，Andrew+微孔板夹持器用于将收集板或支架上的HPLC样品瓶放置到多联器（活动位置）上。这种组合使提取过程无需任何用户干预。

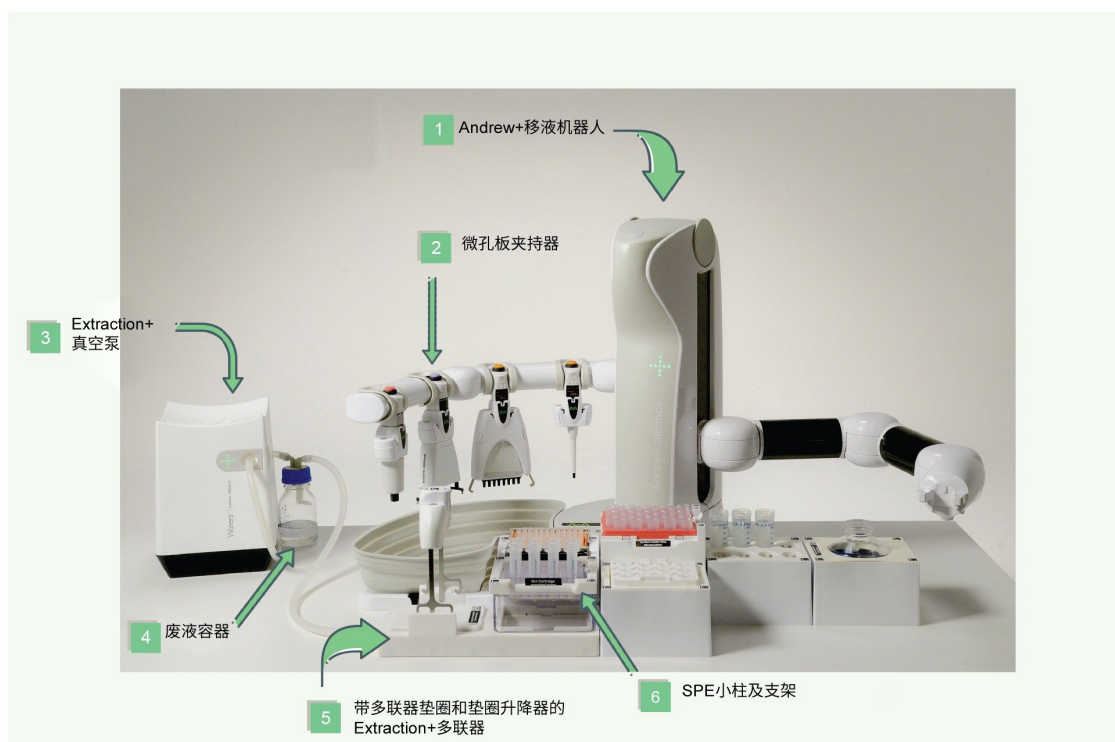


图10.Andrew+，配置所需的Domino、Andrew Alliance蓝牙电子移液枪和工具架上的微孔板夹持器，以及Extraction+系统，包括Extraction+互联真空泵、流通式废液瓶、带多联器垫圈和一体化垫圈升降器的Extraction+多联器以及位于相应适配器中的SPE小柱。

色谱图

图11所示为此应用所分析化合物的色谱图。它们具有不同的极性范围，这可以从保留时间差异中看出。此外还包括带电和中性化合物的混合物。

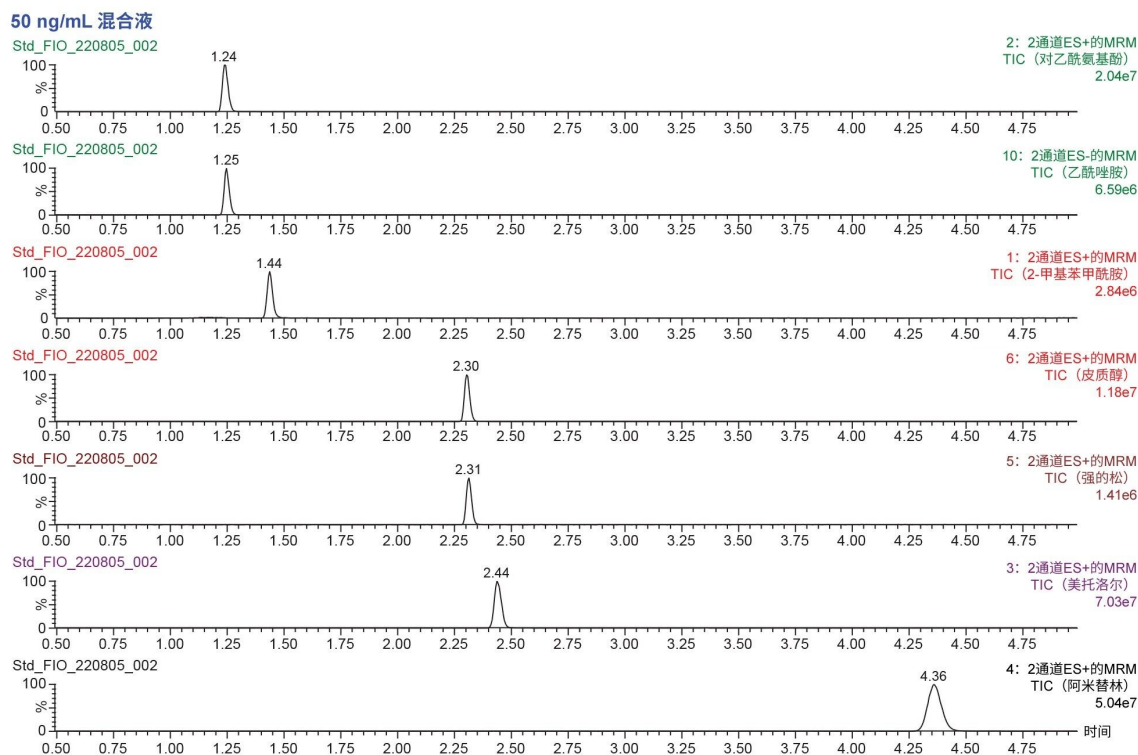


图11.分析物色谱图

样品前处理和SPE小柱/板萃取

Andrew+和OneLab软件能够成功地制备曲线和QC稀释，并使用新的Extraction+功能完全自动化地提取这些制备好的血浆样品。自动混合稀释液确保了性能一致，并体现在定量结果的准确性上。此外还有一些额外优势，包括绝对确定的稀释和样品完整性。只要设定好，就不用担心样品量或试剂添加错误。同样，也没有混淆或调换样品，或者错误地将一批样品全部或部分加标的风险。最后，对真空萃取步骤进行了优化，使样品之间和批次之间保持一致，再次确保了可靠的性能。

定量结果

下面的表2总结了Andrew+制备标样和QC样品，以及随后使用Waters HLB 96孔板和Extraction+萃取血浆样品的定量结果。准确度值的范围为92.1-108.3%。QC结果的精密度也很出色，除一个结果以外，其余结果的%RSD均低于5%。这些结果满足建议的小分子生物分析方法验证限值。分析结果的高精密度证明了Andrew+移液机器人搭配Extraction+装置的样品前处理和SPE自动化的一致性。所选化合物的校正曲线如图12所示。

Oasis HLB 30 mg板 - 稀释和萃取结果						
	低浓度QC		中等浓度QC		高浓度QC	
	平均准确度% (N=3)	%RSD	平均准确度% (N=3)	%RSD	平均准确度% (N=3)	%RSD
乙酰唑胺	102.2	0.7	95.4	2.3	101.0	2.7
对乙酰氨基酚	110.8	6.7	104.7	4.8	92.1	3.0
强的松	93.7	11.7	102.0	7.9	101.8	2.2
2-甲基苯甲酰胺	102.6	3.1	102.6	3.1	97.1	3.1
可的松	103.2	4.4	103.2	1.6	96.7	1.3
美托洛尔	108.1	2.7	108.3	1.8	88.6	0.7
阿米替林	105.4	3.0	105.9	1.0	95.3	1.9

表2.由Andrew+制备并使用Extraction+互联装置从Oasis HLB 96孔板(N=3)中萃取的QC样品的准确度和精密度结果。

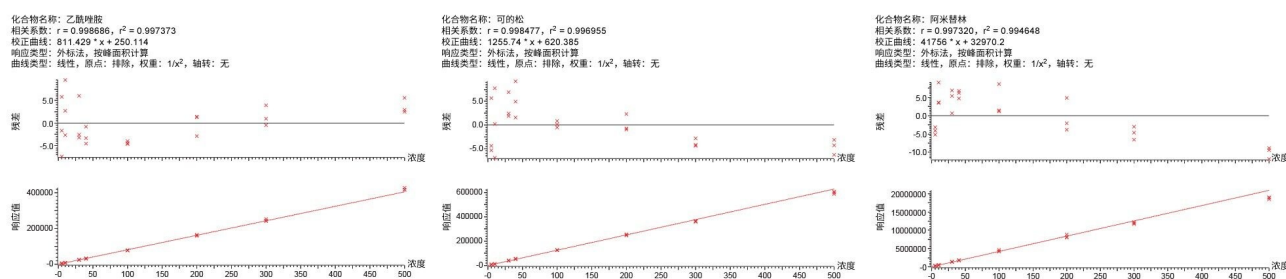


图12.30 mg 96孔板校正曲线

下面的表3总结了Andrew+制备标样和QC样品, 以及随后使用Waters HLB 1 cc小柱和Extraction+互联装置萃取血浆样品的定量结果。准确度值的范围为88.6-110.8%。结果的精密度也很出色, 除一个结果以外, 其余结果的% RSD均 $\leq 5\%$ 。同样, 这些结果也符合建议的小分子生物分析方法验证准则。所选化合物的校正曲线结果如图13所示。

Oasis HLB 1 cc小柱 - 稀释和萃取结果						
	低浓度QC		中等浓度QC		高浓度QC	
	平均准确度% (N=3)	%RSD	平均准确度% (N=3)	%RSD	平均准确度% (N=3)	%RSD
乙酰唑胺	100.2	2.0	99.1	0.8	101.8	1.1
对乙酰氨基酚	107.5	2.4	104.4	1.7	95.8	0.9
强的松	108.4	13.9	98.5	1.2	97.8	3.7
2-甲基苯甲酰胺	96.9	5.3	96.9	5.3	103.7	1.7
可的松	101.6	0.4	99.4	2.3	101.7	2.1
美托洛尔	102.0	5.1	100.7	4.3	96.3	4.5
阿米替林	104.4	2.9	102.8	2.6	97.5	0.8

表3.由Andrew+制备并使用Extraction+互联装置从Oasis HLB 1 cc小柱(N=3)中萃取的QC样品的准确度和精密度结果

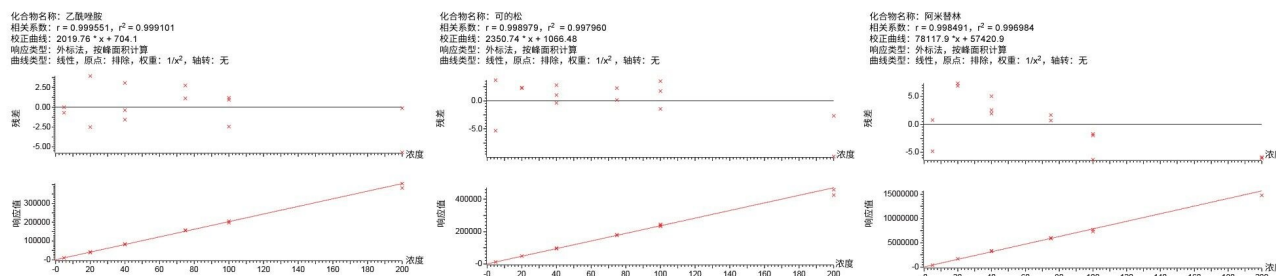


图13.1 cc小柱校正曲线

结论

本应用重点介绍了Andrew+™移液机器人搭配Extraction+互联装置, 结合小柱和96孔板进行SPE萃取全自动样品前处理的成功运用。表2和3所示的精确的数据不仅仅证明了移液步骤的准确性和精密度, 还证明了使用Extraction+执行的萃取方案的性能。结果相近证明优异的性能与萃取规格(小柱vs.萃取板)无关。Extraction+的一个关键特性是能够使用萃取板或小柱执行全自动SPE萃取, 而不需要用户干预。这使得实验室里的科学家可以

专注于其他领域，而不是重复的手动任务。

本应用中重点说明的特征和显示的数据表明，Andrew+和Extraction+ SPE系统能够执行完全自动化的标曲样品和QC样品前处理以及不论使用何种萃取实验器皿的SPE。这些功能与直观、基于云的OneLab软件相结合，可以轻松采用实验室自动化，尽可能提高生产力和减少失误，并确保生物分析LC-MS工作流程的整体分析性能。

特色产品

<ht

[tps://www.andrewalliance.com/pipetting-](https://www.andrewalliance.com/pipetting-robot/)

[robot/](#)

OneLab软件

Andrew+移液机器人 >

[自动化工作流程套装和脚本 </nextgen/cn/ko/products/application-kits/automation-workflow-kits-and-scripts.html>](#)

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 </nextgen/cn/zh/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-uplc-i-class-plus-system.html>](#)

[Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <https://www.waters.com/134889751>](https://www.waters.com/134889751)

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

[TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720007712ZH, 2022年9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](#)