

## 适用于LC-MS/MS生物分析工作流程的简单、稳定的自动化样品前处理和萃取方案

---

Jonathan P. Danaceau, Mary Trudeau

---

### 摘要

以下研究展示了通过将Andrew+™移液机器人与Extraction+互联装置相结合，实现生物分析样品前处理的全面自动化，可用于各种萃取技术，包括蛋白沉淀(PPT)、支撑液体萃取(SLE)、反相固相萃取(SPE)以及混合模式SPE。大多数方案均改编自现有的OneLab™数据库方法，可大幅缩短方法开发时间。Extraction+的流通式废液收集可实现全自动的“无人值守”性能。所有技术的所有自动化生物分析方案得到的结果均表现出优异的准确度和精密度，轻松满足生物分析法规指南的要求。该自动化平台易于实施，具有出色的准确度和精密度，并且可以灵活地执行各种定量生物分析技术。

### 优势

- 使用操作简便且可直观查看数据的OneLab软件创建和传输方法
- 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，无需或只需少量用户干预步骤，利用液体处理功能降低手动失误的风险
- OneLab提供可下载的现成方案，大幅缩短方案开发时间

---

### 简介

---

生物分析样品前处理方法包括简单的技术（例如“稀释-上样”或蛋白沉淀法），以及靶向性更强的专用方法（例如液-液体萃取、固相萃取(SPE)或免疫亲和纯化）（图1）。一般来说，技术越简单，适用性越广，方法开发也越轻松，但需要在洁净度和灵敏度方面做出一定妥协。专属性更高的技术可提供更出色的洁净度、特异性和灵敏度，但适用性更有限，并且可能需要进行更多方法优化。

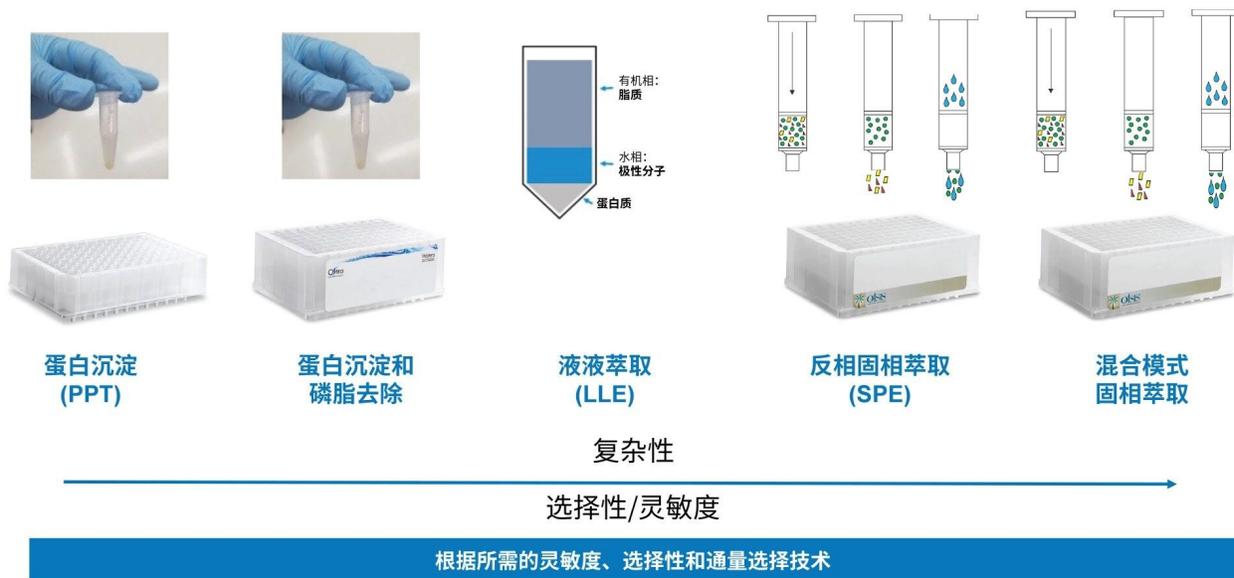


图1.常用生物分析萃取技术的图示

在现代实验室环境中进行生物分析样品前处理时，所有样品前处理技术都面临着一个相同的挑战，那就是如何批次内和批次之间获得一致的结果。移液一致性等技术因变量和其他用户因变量会影响准确度和重复性，在人员流动频繁的实验室环境中尤其如此。其他错误原因包括移取的试剂不正确、意外跳过程序步骤以及样品追踪错误或错位。自动化样品前处理工作流程可以尽量减少或消除许多此类差异性来源。它还有一个额外的好处，那就是让科学家能够有更多时间完成其他任务，并降低了移液风险或重复性劳损。

本研究使用Andrew+移液机器人搭配Extraction+互联装置，实现了样品前处理以及从血浆中萃取治疗药物阿哌沙班的完全自动化。研究采用了几种常见的生物分析技术，包括蛋白沉淀(PPT)、去除磷脂(PL)的PPT、支撑液体萃取(SLE)、反相(RP)SPE、去除PL的RP-SPE和混合模式SPE。每种方法均实现了完全自动化，包括所有移液步骤、萃取过程中使用的真空设置、废液处置和最终收集。通过定性评估（包括分析物回收率、基质效应和残留PL）比较方法的效率和洁净度，并筛选合适的混合模式SPE吸附剂。然后评估定量性能，包括线性、准确度和精密性。对于所有萃取技术，校准标准品和质量控制(QC)标准品的准确度以及相应的%RSD（用作稳定性衡量指标）均

<10%，许多情况下<5%。这些定量结果表明，配备Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人具有常用生物分析样品萃取技术的灵活性和必要的重复性。这有助于提高方法一致性，同时尽可能减少或消除手动样品前处理引入的许多错误和差异性，从而使实验室受益。通过将Andrew+移液机器人与Extraction+互联装置相结合，可实现全自动“无人值守”性能，让各种技术都能获得优异的结果，消除手动错误的风险，让科学家有更多时间执行其他任务，并提供不受用户技术或经验程度所影响的一致性能。

---

## 实验

### 化学品与溶液

阿哌沙班购自Cerilliant([www.cerilliant.com](http://www.cerilliant.com))。13C-d3阿哌沙班购自Cayman Chemicals，用作内标(IS)。使用甲醇配制储备液(1 mg/mL)。大鼠血浆(K<sub>3</sub>EDTA)购自Innovative Research([www.innov-research.com](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。LC-MS级甲酸和磷酸购自Sigma Aldrich。甲基叔丁基醚MTBE购自Avantor Sciences。

### 样品前处理萃取装置

Sirocco蛋白沉淀板Ostro蛋白沉淀和磷脂去除板、Oasis HLB、Oasis PRiME HLB、Oasis吸附剂选择板和Oasis MCX板均购自沃特世。支撑液体萃取(SLE)板(P/N: 96260-1)购自Analytical Sales and Services ([analytical-sales.com](http://analytical-sales.com))。

### 标准曲线和质量控制样品制备

阿哌沙班工作储备液及其内标阿哌沙班13C-d3用甲醇配制，浓度分别为10 µg/mL和100 µg/mL。在回收率和基质效应实验中，使用储备液制备含100 ng/mL阿哌沙班的预加标血浆溶液。使用工作储备液制备血浆中的工作校准品和QC样品，浓度范围为2~500 ng/mL。根据每个样品前处理工作流程的需要，使用100 µg/mL工作储备液制备内标工作溶液。

### 自动化平台

Andrew+移液机器人，搭配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。

### 样品萃取方案

---

表1列出了每种技术使用的OneLab数据库方案，图2展示了每种样品前处理方法所用的方案示意图。在每种情况下，均按照制造商的说明选择合适的体积和溶剂。除PPT方案中的涡旋步骤和SLE方案中的蒸发步骤外，所有步骤均由Andrew+系统全自动完成。从OneLab数据库

<https://onelab.andrewalliance.com/app/lab/D8xeYomN/library> <

<https://onelab.andrewalliance.com/app/lab/D8xeYomN/library>> 下载标准OneLab方案，用于Ostro、Oasis HLB、Oasis HLB PRiME和混合模式筛选方案。2 x 4方法开发方案还包括加标萃取样品以评估分析物回收率的步骤。使用Sirocco板和SLE板创建新的PPT制备方案。

## OneLab方案

| 样品前处理程序                         | 起始数据库方案         |
|---------------------------------|-----------------|
| PPT (使用Sirocco)                 | <b>新方案</b>      |
| PPT (使用Ostro)                   | Ostro蛋白质沉淀      |
| SLE                             | <b>新方案</b>      |
| RP-SPE (Oasis HLB)              | 自动化生物分析SPE      |
| RP- SPE, 去除PL (Oasis HLB PRIME) | 自动化生物分析SPE      |
| 混合模式筛选                          | Oasis 2 × 4方法开发 |
| Oasis MCX 96孔板                  | 自动化生物分析SPE      |

表1.表中列出了样品前处理方法、起始OneLab数据库方案以及OneLab数据库中的方案链接

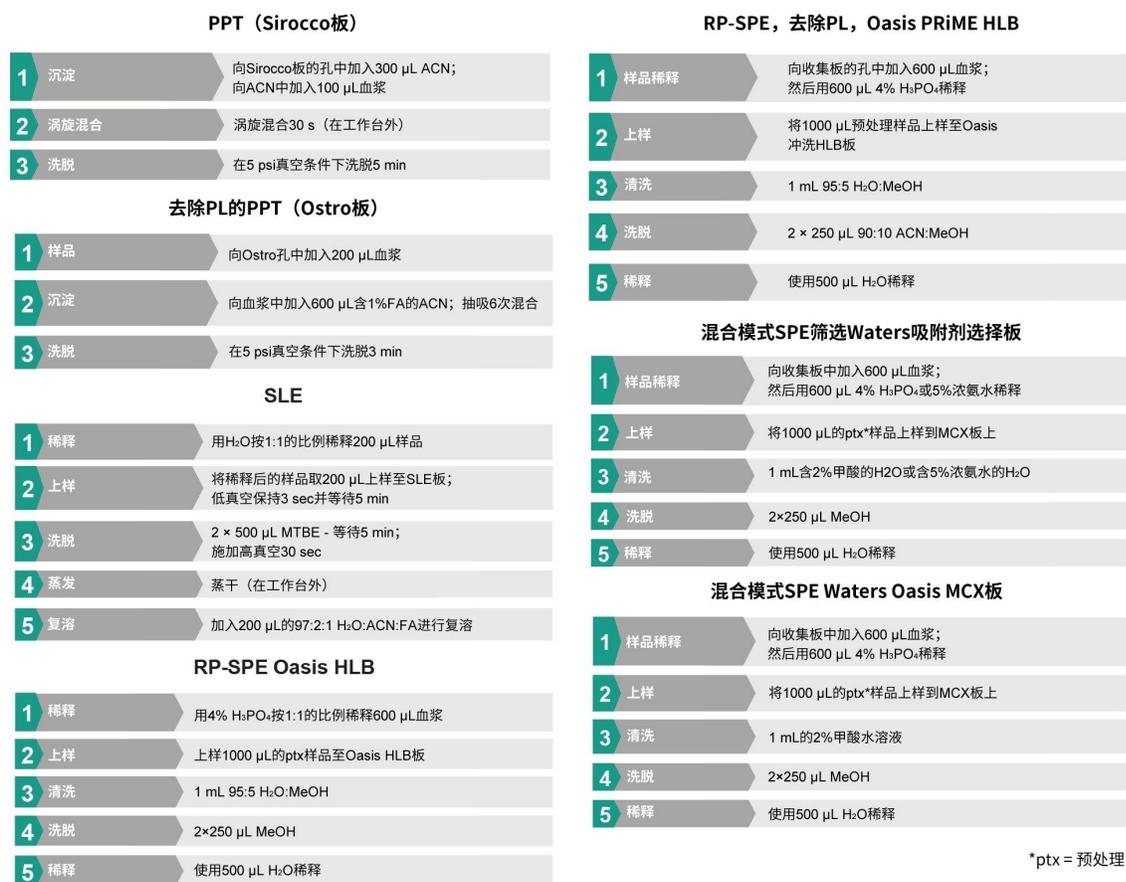


图2. 本研究中使用的所有样品前处理方法的示意图。所有方法均基于制造商指南中的体积和溶剂。ptx代表预处理。

## 液相色谱条件

液相色谱系统:

ACQUITY I-Class UPLC (FL)

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:    | Xevo TQ-S质谱仪  |
| 色谱柱:   | ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱, 1.7 $\mu$ m, 2.1 mm x 50 mm (P/N: 186002350) |
| 柱温:    | 35 °C   |
| 样品温度:  | 10 °C   |
| 进样体积:  | 5 $\mu$ L   |
| 流速:    | 0.5 mL/min  |

## MS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:   | 30 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™      |

---

## 结果与讨论

### 自动化

本研究将Andrew+移液机器人与Extraction+互联装置配合使用，通过上述多种常用样品前处理技术从血浆样品中萃取目标药物（阿哌沙班）。所有移液、试剂添加、样品混合、样品预处理和萃取装置操作均实现完全自动化。Extraction+互联装置可实现流通式废液收集，无需手动处置废液。收集器皿在Extraction+多联器中的放置以及随后移至微孔板Domino的操作也实现了自动化。图3显示了配置有Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人，图4显示了Extraction+互联装置及其附件。

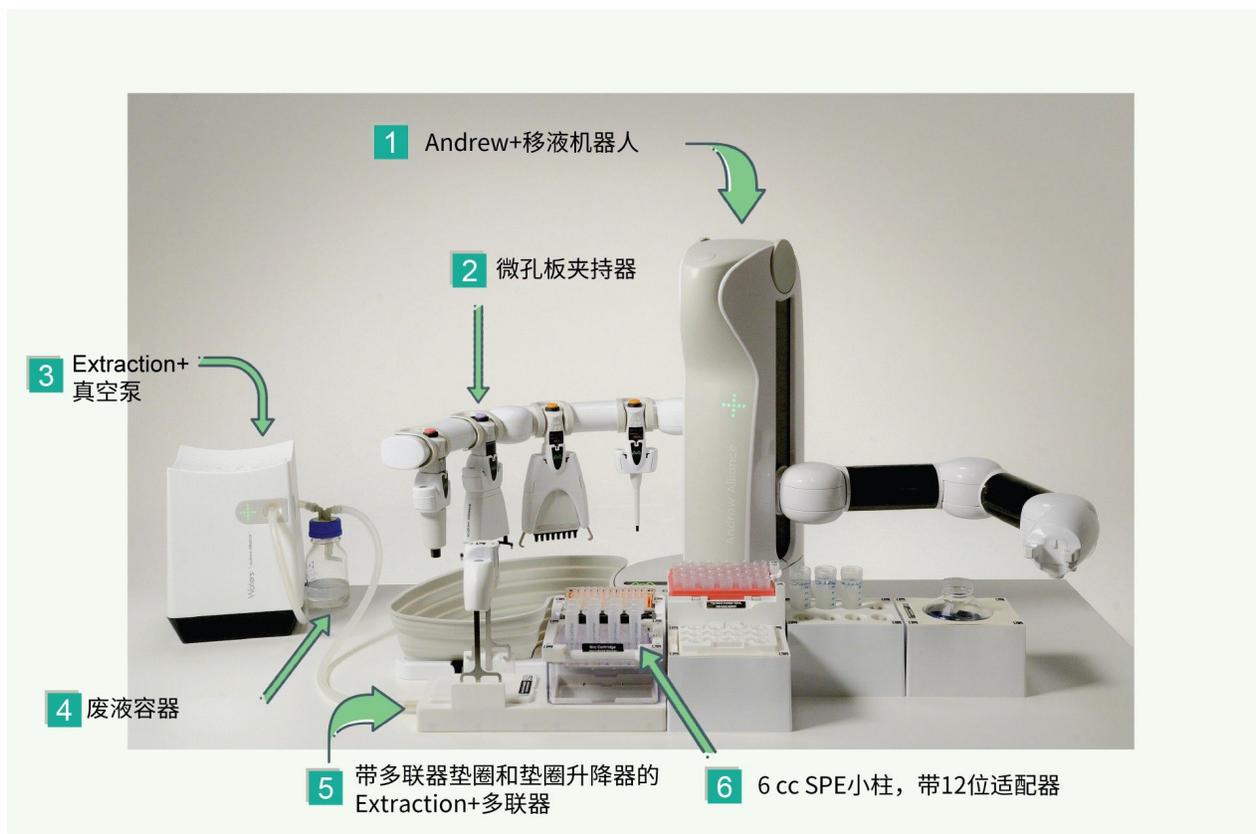


图3. Andrew+移液机器人，配置所需的*Domino*、工具架上的*Andrew Alliance*蓝牙电子移液枪和微孔板夹持器，以及*Extraction+*互联装置，包括与*Extraction+*互联真空泵、流通式废液瓶、带多联器垫圈和一体化垫圈升降器的*Extraction+*多联器以及位于相应适配器中的SPE小柱。

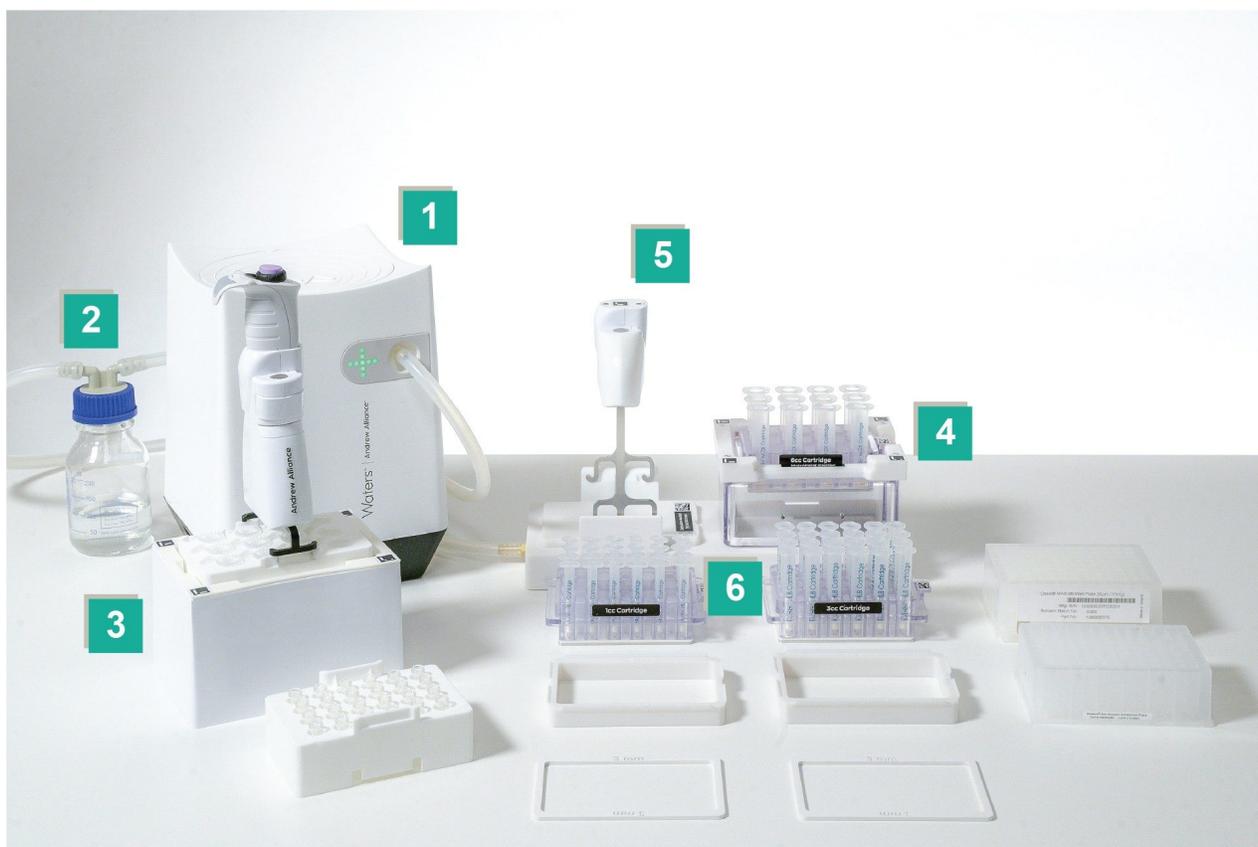


图4.Extraction+互联装置上的一体化真空泵(1)、流通式废液收集瓶(2)、带样品收集架的Domino(3)、萃取多联器(4)和用于移动多联器的垫圈升降器(5)和支架SPE小柱(6)。还突出显示了用于调整收集架高度的垫片。

OneLab软件的功能之一是为所有方案生成设备列表、方案可视化和工作台布局。图5~7展示了使用Oasis MCX 96孔板从血浆中萃取阿哌沙班的示例。本研究中执行的所有7个方案均生成了类似的布局和可视化效果。这样可确保在开始任何方案之前，所有必要的设备和消耗品都在工作台上准备就绪。用户还可以借此将所有必需的Domino和连接的设备设置在适当的位置，并提高系统的易用性。

## OneLab方案图示

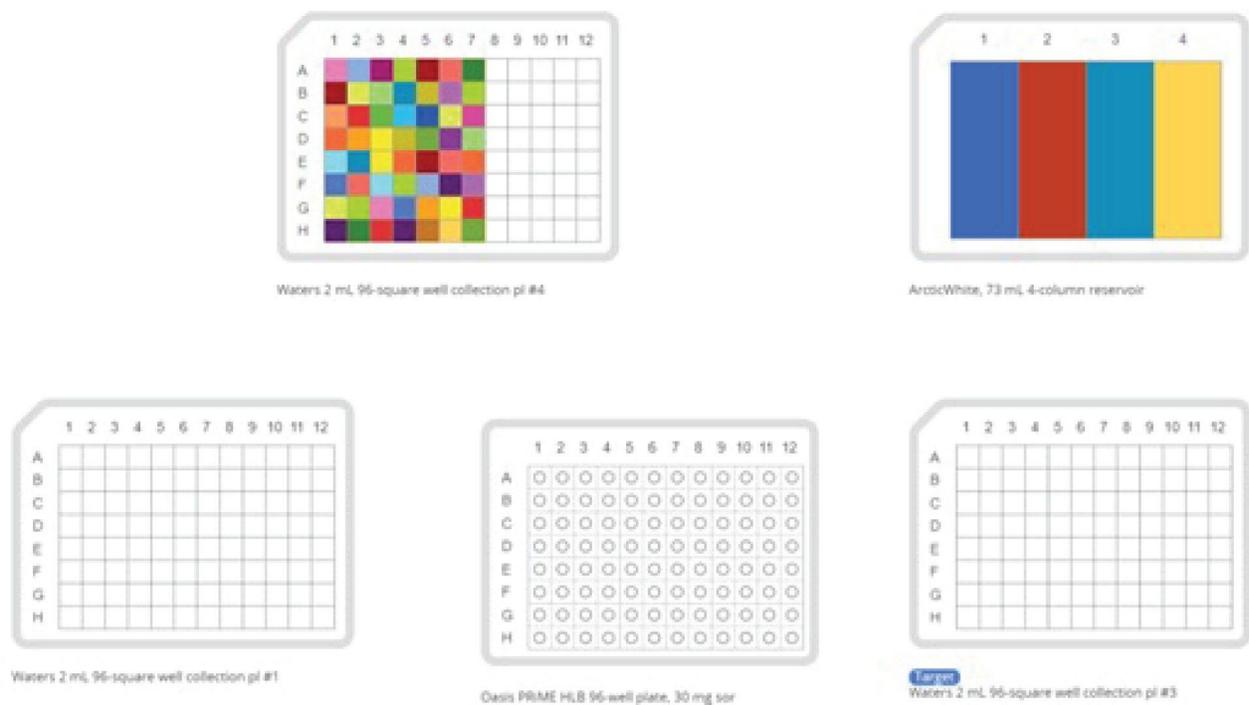


图5.使用Oasis MCX 96孔板萃取阿哌沙班。OneLab软件中显示的SPE方法方案示意图。96孔样品板中的单个样品在左上角用颜色编码，最终的目标样品板在图的右下角注明。

## 使用Oasis MCX 96孔板萃取阿哌沙班

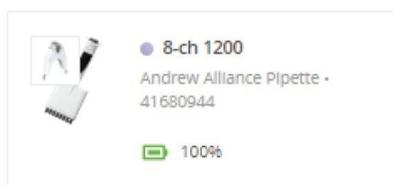
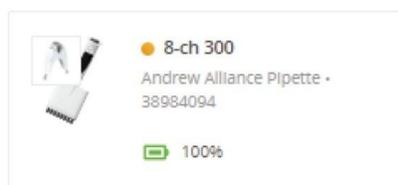
### Andrew+系统组件

#### Domino、电子移液枪和枪头

##### 装置<sup>2</sup>



##### 工具<sup>3</sup>



##### 枪头<sup>2</sup>



##### Domino模块<sup>8</sup>



图6.使用Oasis MCX 96孔板萃取阿哌沙班。OneLab方案使用的仪器列表和方案图示如上。图中展示了所有必需的Domino、互联装置、工具和移液枪枪头。OneLab也为所有其他方案生成了类似的列表。

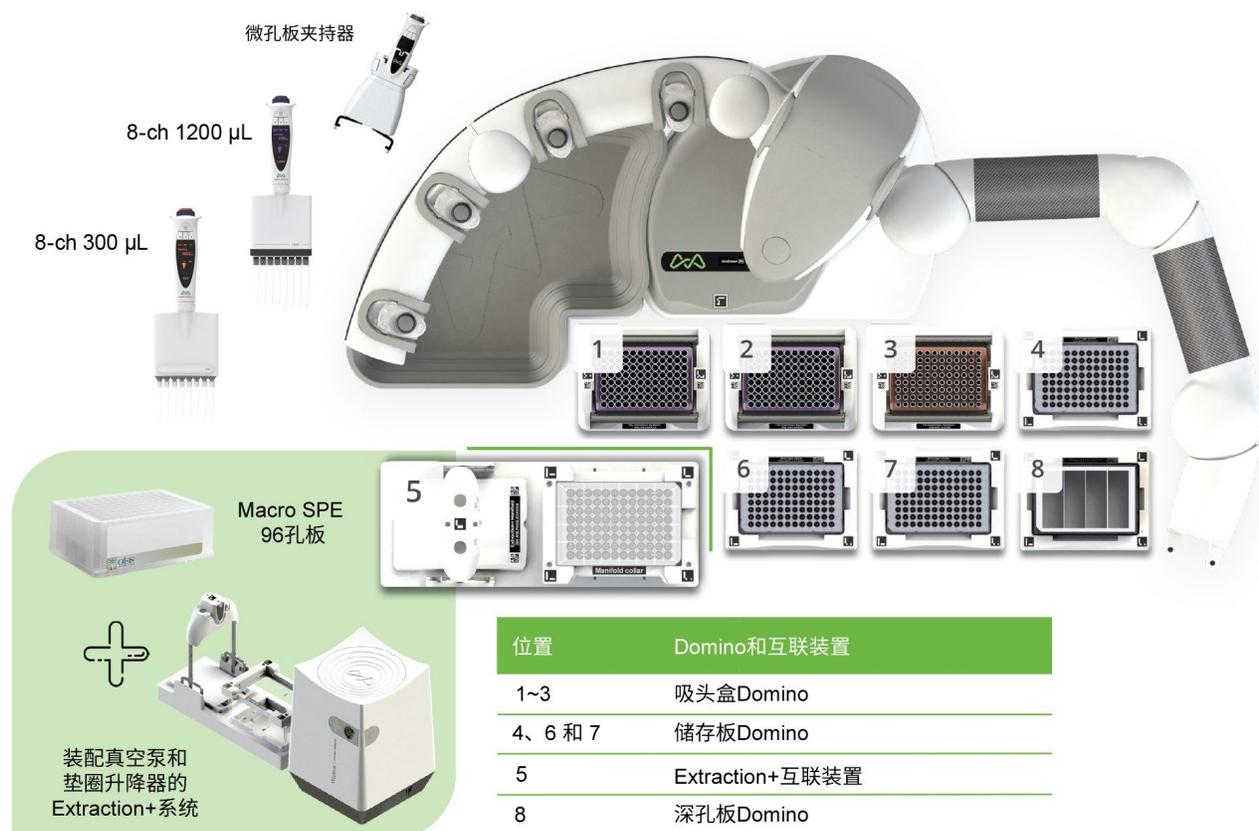


图7.使用Oasis MCX 96孔板萃取阿哌沙班。阿哌沙班混合模式萃取的OneLab方案工作台布局如上，展示了所有组件的摆放位置。图下方列出了所需的Domino和设备。本研究中使用的所有方案均生成了类似的布局。

## 回收率和基质效应

萃取效率和洁净度评价是所有生物分析程序中的关键步骤。具体方法是计算目标分析物的回收率和基质效应。图8显示了样品前处理程序的回收率和基质效应结果。样品前处理技术按选择性从低到高排列，从更通用的方法（例如蛋白沉淀）开始，到选择性和特异性更高的混合模式SPE程序。通过使用更具特异性的方法发现，回收率提高和基质效应降低的总体趋势。两种PPT技术（Sirocco和Ostro）均获得了可接受的回收率，但存在明显的基质效应

。在所有技术中，经SSLE处理的样品的回收率最低。需要注意的是，该技术或任何技术都只进行了少量优化。该性能有望通过一些优化实验得到改善。从SPE技术来看，这种性能提升模式更为明显。所有SPE技术均获得了良好的回收率(>80%)，但基质效应的强度从Oasis HLB的-40%降至HLB PRiME的-13.6%，而Oasis MCX的基质效应可忽略不计。

除执行常规方案外，Andrew+还可用于方法开发和优化。在本例中，使用OneLab数据库中的2 x 4方案能够筛选所有四种混合模式吸附剂。其他混合模式吸附剂（WCX和MAX）的回收率可忽略不计，因此图中未显示。需要注意的是，第一次洗脱的洗脱液用于混合模式吸附剂。阿哌沙班不可电离，预计也不会通过离子交换与混合模式吸附剂结合。因此，相较于HLB或HLB PRiME，混合模式吸附剂的离子交换特性可提供额外的净化效果。由于Oasis MCX的性能优于WAX，而且基质效应更低，因此将该吸附剂用于后续的定量分析。通过将Andrew+移液机器人与Extraction+互联装置配合使用，可快速筛选所有样品前处理技术。许多技术都提供了预配置的方案，也有助于节省时间和快速评估方法。

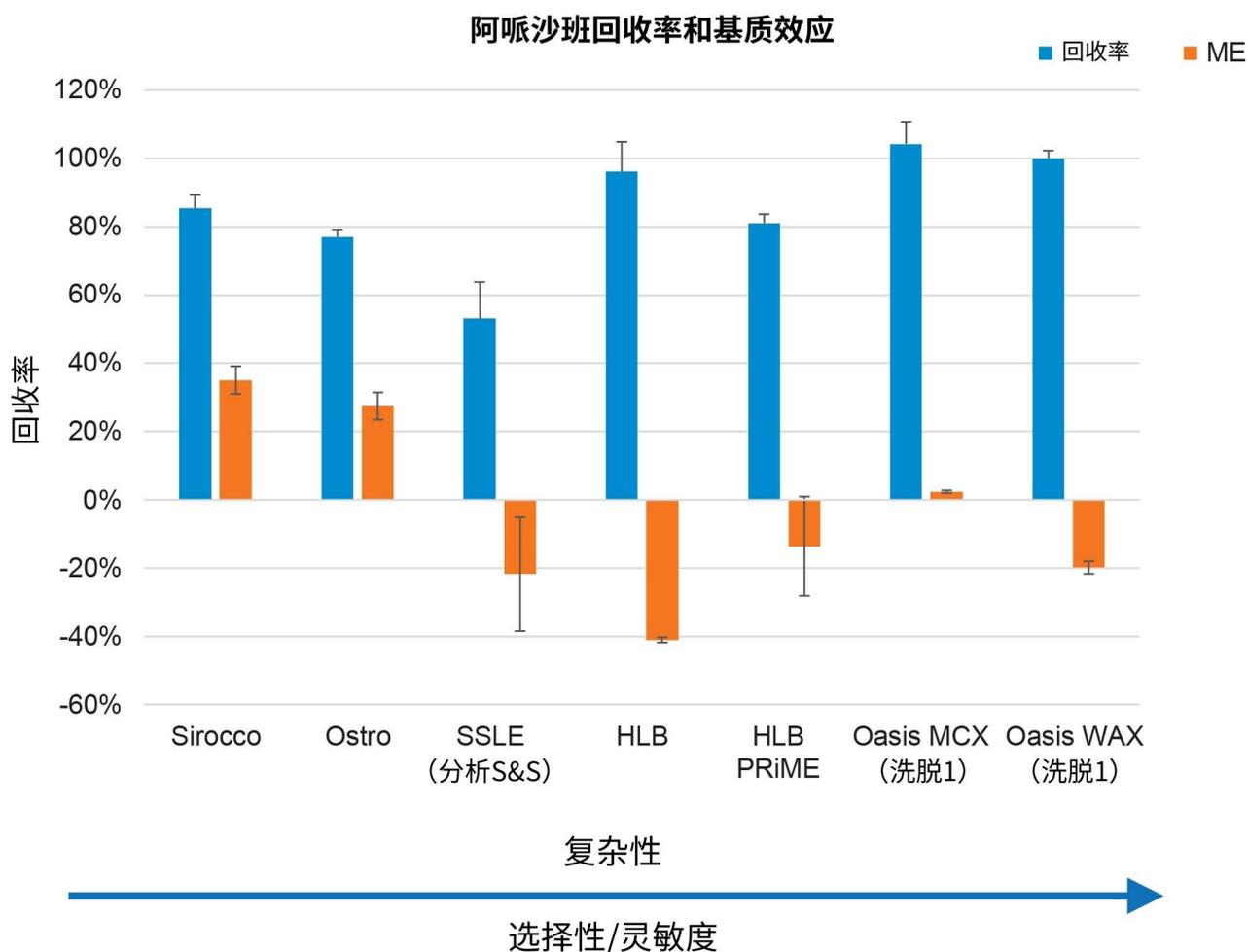


图8.使用上述技术从血浆中提取阿哌沙班的回收率和基质效应。所有移液、真空步骤、废液处理和稀释均由配置有 Extraction+ 互联装置的 Andrew+ 移液机器人执行。

## 定量结果

表3和表4汇总了采用上述样品前处理技术通过 Andrew+ 和 Extraction+ 萃取标准品和 QC 样品得到的定量结果。自动化样品前处理的关键优势之一是可以实现良好的一致性和重现性。所有样品前处理技术的校准曲线范围为 2~500 ng/mL。表3显示，校准品准确度在 86%~111% 的范围内，%RSD < 15% (N=3)，其中许多为个位数。轻松满足 FDA 关于生物分析方法验证的指南要求。表4汇总了与每种技术相关的质量控制结果。尽管不同技术在回收率和基质效应方面存在显著差异（图8），但所有萃取技术的定量性能均非常出色。如表4所示，平均准确度均在标示值的 10% 以内。精密度也非常出色。所有 %RSD 值均为个位数，且除了一例例外，其余所有 %RSD 值均低于 5%，轻

松满足FDA关于方法验证的指导原则。

除了上述优异的重现性外，自动化的关键优势之一是能够大幅减少甚至消除手动样品前处理过程中可能发生的人员失误。这些问题可能包括移液错误的样品，可能是错位，也可能是遗漏一行或一列样品。自动化还避免了试剂添加错误。OneLab软件可确保在适当的时间以正确的体积添加正确的试剂。同样，也可以消除添加内标的误差。自动化样品前处理功能可大幅减少所有这些常见错误以及其他错误。

| 萃取技术                             | 动态范围        | R <sup>2</sup> | 曲线加权             | %准确度范围<br>(N=3) | %RSD<br>(N=3) |
|----------------------------------|-------------|----------------|------------------|-----------------|---------------|
| PPT<br>(Sirocco)                 | 2-500 ng/mL | 0.993          | 1/x <sup>2</sup> | 92.4-105.5      | 0.2-3.7       |
| 去除PL的PPT(Ostro)                  |             | 0.997          |                  | 97.6-103.4      | 0.2-14.9      |
| SSLE                             |             | 0.993          |                  | 86.0-109.1      | 0.4-6.1       |
| RP SPE (HLB)                     |             | 0.996          |                  | 93.4-109.9      | 0.7-2.4       |
| 去除PL的RP SPE<br>(Oasis PRIME HLB) |             | 0.996          |                  | 87.9-110.8      | 0.3-3.8       |
| 混合模式SPE<br>(MCX)                 |             | 0.996          |                  | 94.2-109.7      | 0.2-3.7       |

表3.使用配备Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人进行萃取得到的校准曲线性能(N=3)。其中列出了每种样品前处理技术的曲线拟合、%准确度和%RSD。

| 定量质控结果                           |                 |       |                 |       |                 |       |
|----------------------------------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|
|                                  | 低浓度QC           |       | 中等浓度QC          |       | 高浓度QC           |       |
|                                  | 平均准确度%<br>(N=3) | % RSD | 平均准确度%<br>(N=3) | % RSD | 平均准确度%<br>(N=3) | % RSD |
| PPT (Sirocco)                    | 92.6            | 1.0   | 97.9            | 1.8   | 95.0            | 0.3   |
| 去除PL的PPT(Ostro)                  | 98              | 6.2   | 99.9            | 0.8   | 94.6            | 1.3   |
| SSLE                             | 97.0            | 1.4   | 96.1            | 1.8   | 90.8            | 0.6   |
| RP SPE (HLB)                     | 100.9           | 0.8   | 99.1            | 3.9   | 89.9            | 4.2   |
| 去除PL的RP SPE<br>(Oasis PRIME HLB) | 103.0           | 2.0   | 99.4            | 0.5   | 93.3            | 0.3   |
| 混合模式SPE (MCX)                    | 105.7           | 3.0   | 103.7           | 2.3   | 96.1            | 1.0   |

表4. QC样品和使用配备Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人萃取的准确度和精密度结果。

## 结论

本应用重点介绍了Andrew+™移液机器人搭配Extraction+互联装置，对多种常见生物分析样品前处理技术实现样品前处理的全面自动化。此外，OneLab数据库中提供的方法可用于大幅缩短方案开发时间。除一些细微干预外，萃取技术的所有方面均实现了完全自动化，包括移液、混合、真空曲线、废液处理和样品稀释。回收率和基质效应数据表明，Andrew+和Extraction+具有通用性和灵活性，可以执行各种样品前处理技术，从而快速评估和分析方法以确定适合的方法。定量分析结果表明，该自动化系统具有出色的精密度，大多数情况下%RSD可达到个位数。

生物分析样品前处理工作流程的自动化可带来诸多好处。出色的可靠性和重现性可提供一致的结果，结果通常等于甚至超过手动制备所获得的结果。几乎消除了其他误差来源，例如样品错位、添加的试剂不正确、加标错误以及真空洗脱等技术敏感步骤，从而降低了批次失败的风险并提高了分析效率。省去实验室中的繁重手动移液任务，还有助于降低实验室科学家因重复性劳损而受伤的风险。从最终结果来看，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。

## 特色产品

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

[Xevo TQ-S质谱仪 <https://www.waters.com/10160596>](https://www.waters.com/10160596)

[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)

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

<https://www.andrewalliance.com/laboratory-software/>

Andrew+移液机器人 >

OneLab软件 >

720007906ZH, 2023年6月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号