

使用Echo™ MS系统进行真正的高通量生物分析

利用声波激发与质谱耦合技术可以快速进行样品分析，大大缩短了生物分析研究的周期

Rolf Kern¹, Chang Liu²

¹ SCIEX, USA, ² SCIEX, Canada

分析生物样品以评估候选药物的药代动力学（PK）特点是几乎所有制药公司都要例行进行的基础分析。尽管药物的药代动力学信息在药物发现和开发中具有重要意义，但生物分析数据的获得需要花费大量时间。通常要对多个研究对象的许多单独的时间点进行分析，从而生成每个化合物的数据。考虑到制备样品的时间，即使只是使用简单的蛋白质沉淀制备方法，再加上最快的情况下也需要1到2分钟的分析时间，那么生物分析研究工作通常也要到第二天才能获得数据。

SCIEX Echo™ MS系统，采用声波激发液滴喷射技术，通过开放式探针接口连接到高灵敏度的 SCIEX Triple Quad™ 6500+ 系统，能够显著缩短分析时间，同时降低了样品制备的需求。这使得药代动力学研究数据可以在样本制备的当天获得，使研究人员更快地获得这一重要数据（图1）。

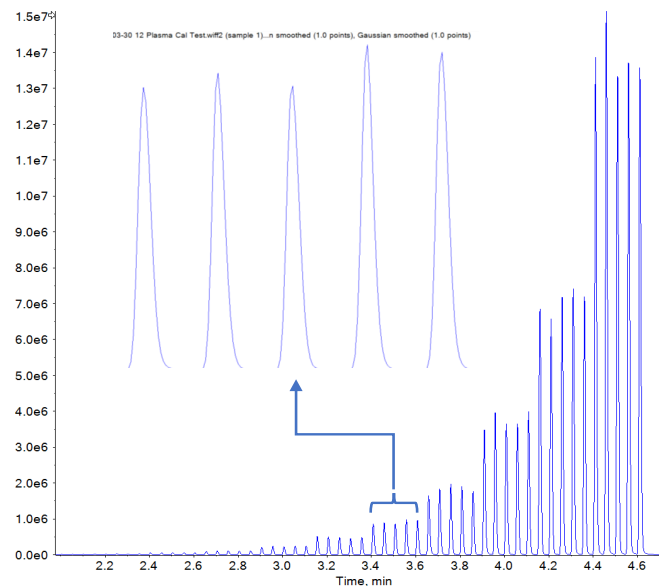


图1. 5分钟内完成完整的血浆药代动力学研究。在不到5分钟的时间内，可以产生一条芬太尼未经处理的血浆标准曲线，包含16个不同血浆浓度点，每个浓度点重复5次。

合适的样品制备方法的选择通常需要平衡灵敏度、通量以及耗材的成本（例如固相萃取柱的消耗）等因素。对于灵敏度比较容易满足要求的生物分析来说，更快的分析速度和更简单的样品制备方法可以使整个的样品分析过程更高效。在此，结合SCIEX Echo™ MS系统我们开发了非常简单的样品制备技术，以快速完成常规生物分析研究。

使用Echo™MS系统进行常规生物分析的主要特点

- Echo™ MS系统与高灵敏度的SCIEX Triple Quad 6500+系统结合在一起，可以满足生物分析的灵敏度要求
- 使用三种不同的简单的样品制备方法均达到了较好的定量限，满足许多常规生物分析的通量和成本需求
- 即使在未经处理的血浆样品中也可以获得很好的分析重现性
- Echo™ MS系统超高的分析速度、较低的系统残留再结合简单的样品制备方法，逐渐形成一个高效的、专用的生物样品分析平台

方法

样品制备：芬太尼（Cerilliant公司）工作标准品采用10%的甲醇水溶液从65.536 mg/mL以1:1稀释比例连续稀释至0.002 mg/mL。以诺芬太尼（Cerilliant公司）为内标，用10%甲醇水溶液稀释至200 ng/mL。

将10 μL的待测物工作溶液和10 μL的内标工作溶液添加到200 μL带有K2EDTA抗凝剂的SD大鼠血浆中。同时大鼠血浆中分别添加0.1%和0.01%体积比的PEG400（Sigma）制备如上相同的标准品样品。

蛋白质沉淀：将100 μL制备好的血浆样品转移到锥形底部96孔板中。向每个标准血浆样品中加入100 μL甲醇，盖住96孔平板并在轨道平板振动筛上振摇混合5分钟。将96孔平板以4000 rpm/min离心10分钟以达到蛋白沉淀的效果。将60 μL上清液转移至Echo 384孔板（贝克曼生命科学384PP 2.0微型板）进行分析。

1:1稀释：取30 μL制备好的血浆样品转移至Echo 384孔板中。然后每个样品中各加入30 μL水，并在轨道振动筛上将384孔板振摇混合5分钟。

未处理血浆：将60 μL制备的血浆样品转移至Echo认证的384孔聚丙烯2.0微孔板中（384PP 2.0）。

在样品分析之前，最终的样品进样板以3000 rpm/min的速度离心以去除进样孔内的气泡，然后在轨道振动筛上振摇混合以确保在每个样品孔内形成稳定的液面。

质谱分析：使用SCIEX Triple Quad 6500+系统，采用表1中列出的参数，以正离子模式采集MRM数据。关键离子源参数如表2所示。注意在分析中，GS1的值是90，这个值需要比通常使用时要高一些，因为GS1或雾化气流提供了引力，将载体溶剂从开放式探头接口带入离子源。

表1. MRM参数

分析物	Q1	Q3	Dwell	DP	EP	CE	CXP
芬太尼	337.2	188.1	45	70	10	30	11
诺芬太尼	233.0	84.1	45	55	10	24	5

表2. 离子源参数设置

参数	设置
GS 1	90
GS 2	70
CUR	30
CAD	12
Temp	350
IS	5000

声波激发液滴进样法：声波激发液滴进样法在Echo™MS系统中相当于液质联用系统中的高效液相色谱进样系统，其参数相对较少。

流速一般基于载体溶剂的粘度进行设置，本研究采用的是纯甲醇作为载体溶剂。

溶剂类别将基于样品液体的粘度来进行选择；粘度小于水的样品液体使用SP类型，粘度等于或大于水的样品液体使用AQ类型。

对于极“脏”的基质样本可以在采集方法中设置延迟时间，从而使得两针样品进样之间有充分的采集时间获得稳定的基线水平。对于生物样品分析工作，增加额外的1000 ms延迟时间，以确保高浓度样品进样后不会提高后续低浓度样品的基线。而对于基质为水或有机溶剂的样品通常不需要这样做。

液滴数是指很短的时间内连续脉冲一次激发进样的液滴数量，类似于高效液相色谱进样系统中的进样体积。进样的最佳液滴数取决于样品基质和所需的灵敏度。复杂的基质采用较高的进样液滴数反而会出现响应的降低，因为基质抑制效应和峰展宽效应抵消了更多的进样液滴数带来的分析物响应的提升。更干净的基质通常可以显著提高灵敏度（在一些情况下液滴数可以提高到20滴）。在进行分析方法开发时，进行不同液滴数的优化有助于选择最佳进样液滴数。

图2展示了对蛋白沉淀标准曲线进行进样液滴数优化的实验结果。在图2中，我们可以看到当进样液滴数在1到5个液滴时，待测物信号成线性增加，进样液滴数在8到9个液滴时，信号响应趋于平稳。因此这种基质类型样品最终选择了8个进样液滴数。

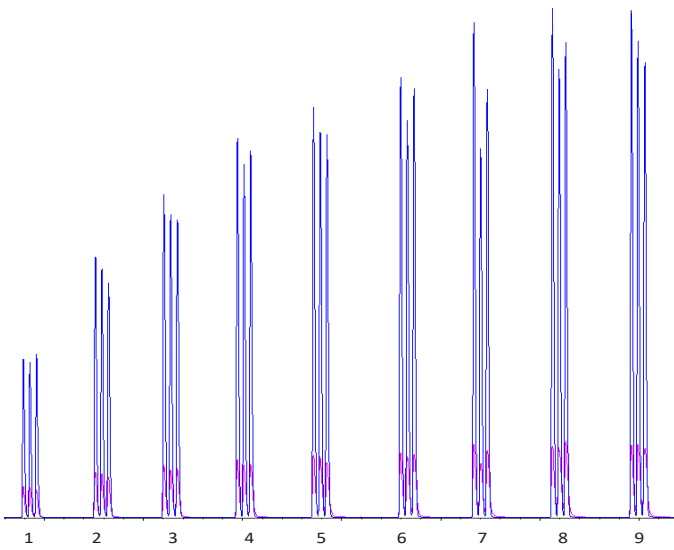


图2.蛋白质沉淀方法制备样品的液滴数优化结果。在分析开发过程中进行进样液滴数优化可以平衡待测物的信号响应和基质效应。这里x轴是芬太尼蛋白沉淀血浆样品的进样液滴数（每个液滴数重复进样3次）。8个液滴数是该实验确定的最佳液滴数。

表3列出了三种不同样品制备方法对应的声波激发进样的方法参数。

表3. 声波激发进样方法参数

参数	血浆	1:1稀释	蛋白沉淀法
流速	350	350	350
流体类型	AQ	AQ	SP
延迟时间	1000 ms	1000 ms	1000 ms
液体数量	5	4	8

数据处理：一旦一个分析批的采集完成，一个拆分算法文件就会自动运行，这个文件是在采集的.wiff2文件时创建的单独文件，.wiff2文件可以在SCIEX OS 软件分析模块中处理。在高通量情况下，可以由LIMS或其他软件进行计算，如果在批处理中指定了处理方法，则可以自动生成峰面积。在本实验中，数据的处理与分析模块中的标准生物分析数据相同。

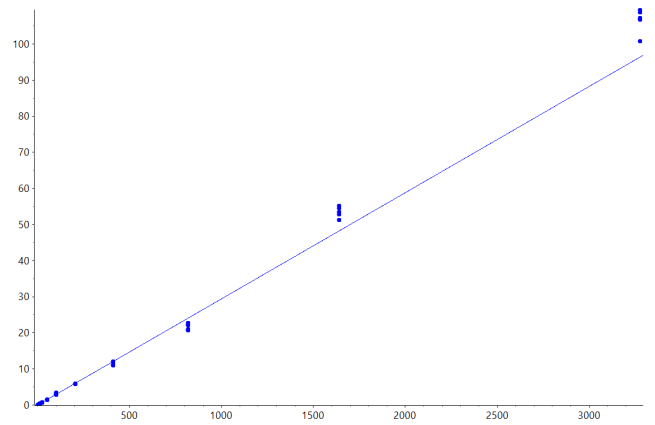


图3.芬太尼未经处理血浆样品标准曲线示例。未经处理血浆样品中芬太尼浓度从x到y ng/mL的标准曲线，每个浓度水平重复采集5次。

不同样品制备方法的灵敏度

研究了三种不同的样品制备方法来考察基质复杂度对生成数据质量的影响。每种样品制备方法均采集芬太尼的浓度曲线，考察定量下限（LLOQ）、线性和重现性。图3显示了芬太尼在未经处理血浆中的曲线示例。在最低浓度样品进样之前先进空白样品，以确定最低定量限（图4）。总的来说，未经处理的血浆中获得的数据最好。

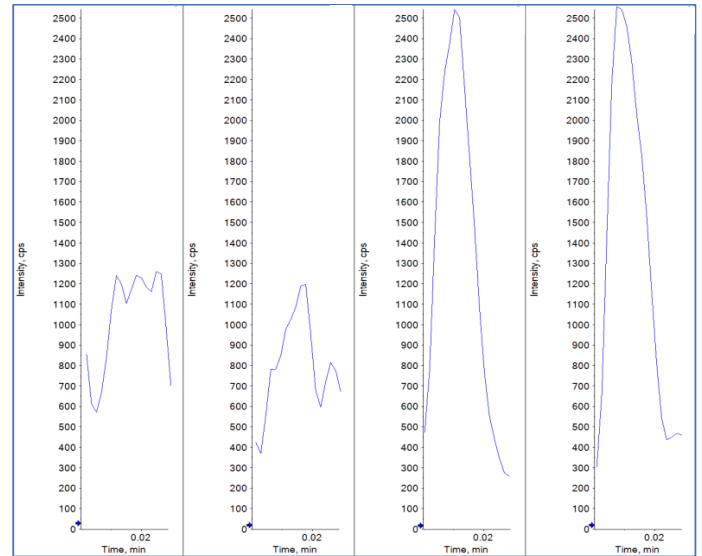


图4. 芬太尼定量下限信号响应。0.2 ng/mL未经处理芬太尼血浆标准添加样品进样后采集空白样品，结果显示最低定量限样品具有较好的信号响应。

表4. 每种样品制备方法制备的标准曲线的重现性。变异系数是每个浓度水平重复采集5次计算所得，大多数浓度水平的变异系数均低于5%。

标准品浓度	血浆	血浆:水	蛋白沉淀法
0.1	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0.2	9.4	BLOQ	BLOQ
0.4	7.6	10.6	9.5
0.8	5.5	*	6.4
1.6	10.3	5.6	7.6
3.2	3.5	8.1	6.9
6.4	3.9	3.9	4.7
12.8	3.8	8.8	1.9
25.6	6.8	4.2	4.8
51.2	2.4	3.9	6.6
102.4	7.7	3.4	2.9
204.8	1.8	7.2	6.1
409.6	4.2	3.9	4.9
819.2	3.9	3.7	6.9
1638.4	2.8	4.4	5.2
3276.8	3.2	3.2	5.9

* 代表标准添加样品在采集过程中数据丢失；
BLOQ代表低于定量限；

无论使用哪种样品制备方法，标准曲线上的每个浓度点重复进样的平均准确度均应在标示值的85%-115%。采用不同样品制备方法得到的所有浓度水平的重现性如表4所示。值得注意的是，在分析灵敏度和变异系数方面，三种不同的样品制备方法不存在显著性差异。

基质抑制效应的评估

除了灵敏度、重现性和线性外，蛋白基质的抑制效应还可以通过分析血浆中标准添加PEG400来考察，在数据处理时该样品可以作为质控样品。

表5. 不同PEG400浓度水平下观察到的基质效应。此表展示了102.4 ng/ml浓度水平待测物标准添加样品（顶行）和质量控制样品的结果。数值为n=5。

基质	峰面积 变异系数%	平均 计算浓度	平均准确度
血浆，无PEG400	7.7	104.8	102.4%
血浆以体积比添加 0.01% PEG400	5.3	99.4	97.1%
血浆以体积比添加0.1% PEG400	3.2	76.7	74.9%

PEG400是药物研究中常用的配方剂，对电喷雾电离具有显著的抑制作用。稳定标记的同位素内标通常可以补偿这种电离抑制，只要分析物的浓度水平高于最低定量限样品，就可以准确定量分析。在药代动力学的研究工作中，稳定的同位素内标并不是都能获得，所以也经常选择化学结构相似化合物。即使选择化学结构性质相似的化合物作为内标，但是电离抑制往往会对分析物和内标物产生不同程度的抑制影响，特别是当它们在色谱上被完全分离的时候。在这种情况下，我们选择了芬太尼的代谢物诺芬太尼作为内标，并且不用考虑色谱分离的情况。以102.4 ng/mL待测物水平为例，不同浓度PEG400对于未经处理血浆样品的基质影响见表5。不同的标准添加浓度血浆样品的基质效应在两个PEG400浓度水平下的结果与102.4 ng/ml水平下结果非常相似。

结论

本研究的目的是评估在早期的常规的生物样品定量分析中Echo MS系统的适用性。在本研究中考察了三种不同的血浆样品制备方法来评估最简单的样品制备方法对于数据质量的影响。结果显示，使用稀释、基本的蛋白沉淀和不经前处理直接进样这三种样品制备方法之间对于最终的数据结果并没有显著性差异。

对于常规分析而言，Echo MS系统的分析灵敏度要求是足够的，在这种情况下Echo MS系统分析的速度和操作的简便性对于周期性比较长的生物分析实验室来说是一个极具吸引力的选择。

在接下来的研究工作中，我们将考察更复杂的样品制备方法（例如固相萃取技术）对灵敏度的影响。此外，还将考察稳定的同位素内标的使用，从而进一步提高数据质量。

参考文献

1. Rapid MS/MS analysis with Acoustic Ejection Mass Spectrometry (AEMS) - Using the SCIEX Echo® MS System to break bottlenecks in quantitative mass spectrometry throughput. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11385-A.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。

本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。Echo和Echo MS是属于美国或在其他国家地区的Labcyte, Inc.的商标或注册商标，该商标经许可使用。所示图像仅用于说明目的，可能不是产品和/或技术的精确表示。样品盘可以从贝克曼库尔特生命科学事业部购买。- Beckman Coulter®商标经许可使用。

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-11649-ZH-A. AB SCIEX™ 商标经许可使用。



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390

全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333

官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835

官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)