

應用文集 - SCIEX Echo MS 系統

/// Echo[®] MS System

RUN **FAST.**



Powered by SCIEX OS



The Power of Precision

目錄

發表文章

1. 發表文章目錄

技術

1. 聲波激發與質譜耦合技術進行快速質譜分析
Rapid MS/MS analysis with Acoustic Ejection Mass Spectrometry (AEMS)

藥物研究及生物製藥應用

1. 使用 Echo MS 系統加速藥代動力學分析和代謝物監測
Accelerated pharmacokinetic profiling and metabolite monitoring Using Echo MS System
2. 超快速、準確和同步定量人血漿中的 ritonavir 和 lopinavir
Ultra-fast, accurate and simultaneous quantification of ritonavir and lopinavir in human plasma
3. 使用 Echo MS 系統進行真正的高通量生物分析
True High Throughput Bioanalysis Using the Echo MS System
4. 快速定量分析發酵液樣品以評價酵母菌工程的轉化效率
Rapid quantitative analysis of fermentation broth samples to assess efficiency of engineered yeast strain turnover
5. SCIEX Echo MS系統對發酵液中多種成分進行快速高通量篩選
Rapid and High Throughput Screening of Multiple Components in Fermentation Broth by SCIEX Echo MS System

食品安全、環境分析及法醫毒理檢測應用

1. 超快速定量人血漿提取物中的 alprazolam
Ultra-fast quantification of alprazolam in human plasma extracts
2. 聲波激發耦合質譜儀 (AEMS) 超快速檢測污水中 17 種毒品的含量
AEMS ultra-fast detection of the concentration of 17 drugs in sewage

發表文章目錄

1. Acoustic dispensing-mass spectrometry: the next high throughput bioanalytical platform for early drug discovery
DOI: 10.4155/bio-2017-4980
2. Operational Modes and Speed Considerations of an Acoustic Droplet Dispenser for Mass Spectrometry
DOI: 10.1021/acs.analchem.0c02999
3. Ultrahigh-Throughput ESI-MS Sampling Pushed to Six Samples per Second by Acoustic Ejection Mass Spectrometry
DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01632
4. Ultrahigh-Throughput and Chromatography-Free Bioanalysis of Polar Analytes with Acoustic Ejection Mass Spectrometry
DOI: 10.1021/acs.analchem.0c03006
5. Ultra-High-Throughput Acoustic Droplet Ejection-Open Port Interface-Mass Spectrometry for Parallel Medicinal Chemistry
DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.0c00066
6. Acoustic Ejection Mass Spectrometry for High-Throughput Analysis
DOI: 10.1101/2020.01.28.923938
7. Acoustic Droplet Ejection and Open Port Interface for Rapid Analysis of Metabolic Stability Assays
DOI: 10.1016/j.xphs.2020.07.025
8. Emerging Chromatography-Free High-Throughput Mass Spectrometry Technologies for Generating Hits and Leads
DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.0c00314
9. Acoustic Ejection/Full-Scan Mass Spectrometry Analysis for High Throughput Compound Quality Control
DOI: 10.1177/2472630320967625
10. Direct Analysis from Phase-Separated Liquid Samples using ADE-OPI-MS: Applicability to High-Throughput Screening for Inhibitors of Diacylglycerol Acyltransferase 2
DOI: 10.1021/acs.analchem.0c04312
11. Fluid Dynamics of the Open Port Interface for High-Speed Nanoliter Volume Sampling Mass Spectrometry
DOI: 10.1021/acs.analchem.1c01312
12. Acoustic Ejection Mass Spectrometry: A Fully Automatable Technology for High-Throughput Screening in Drug Discovery
DOI: 10.1177/24725552211028135
13. Ultra high-throughput mass spec for life sciences research
DOI: <https://www.nature.com/articles/d42473-020-00307-5>
14. High-Throughput Analysis from Complex Matrices: Acoustic Ejection Mass Spectrometry from Phase-Separated Fluid Samples
DOI: 10.3390/metabo11110789

聲波激發與質譜耦合技術進行快速質譜分析

SCIEX Echo™ MS系統突破定量質譜分析通量的瓶頸

Rolf Kern¹, Chang Liu², Chiu Cheong Aw³

¹SCIEX, USA, ²SCIEX, Canada, ³SCIEX, Singapore

自從質譜儀商業化以來，色譜分離技術（如高壓液相色譜）與質譜儀的聯用已成為定量分析的標準方法。電噴霧電離（ESI）與大氣壓化學電離（APCI）和基質輔助鐳射解吸電離（MALDI）等其它方式相比，具有化合物覆蓋範圍廣，電離效率高的優勢，是液相色譜和質譜聯用中常用的電離技術。本文介紹了一種新開發的聲波激發與質譜耦合（AEMS）平臺-SCIEX Echo™ MS系統，用於快速、無需色譜的質譜分析。

高通量篩選（HTS）分析通常用於早期藥物研究，從含有成千上萬種化合物的庫中識別候選藥物，通常依賴於讀板儀生成的資料。讀板儀的主要特點是，一旦開發出檢測方法，便可以快速運行，在不到一分鐘的時間內得到整個板中每個樣品孔的資料。但是這種分析方法的開發是非常耗時的。而且，實際信號輸出通常基於目標化合物與標記物引起的吸收或發射的反應而不是化合物本身，這會導致特异性問題並使疑難排解複雜化。Echo MS系統整



合化合物調諧的簡便性和質譜的特異性和讀板器儀的通量優勢，使該技術成為高通量篩選研究的可行性選擇。

高通量定量的Echo MS系統的主要特點

- 採用聲波激發進樣和開放式探針取樣介面的快速樣品分析
- 對於單一分析物，每秒採集1個樣本，在多重模式下，每秒採集多達3個樣本
- 高重複性的樣品進樣
- 非常低的殘留
- 採用OptiFlow™ TurboV離子源穩定高效的電噴霧電離技術實現廣泛的化合物覆蓋度
- 行業證明，SCIEX Triple Quad™ 6500+ LC-MS/MS系統具有高靈敏度和定量耐用性的特點
- SCIEX OS軟體操作的簡便性
- 專為高通量篩選工作流程而設計；大多數機械臂均可抓取進樣板託盤
- 開放的軟體API可將平臺集成到現有的自動化高通量篩選工作流程中

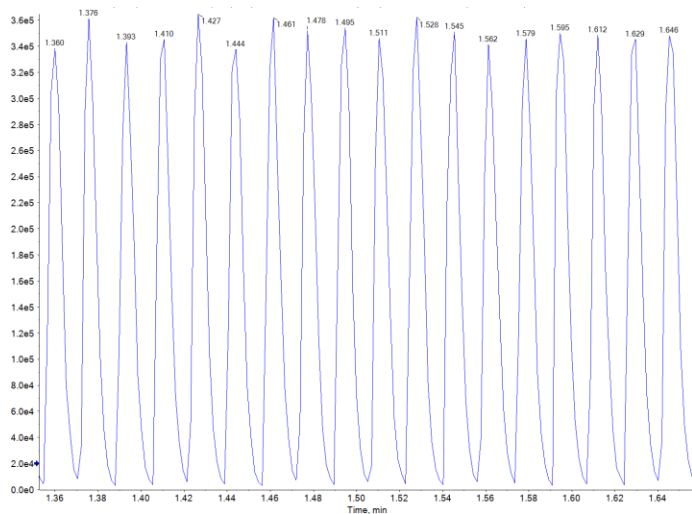


圖1. 快速，重現性好的定量結果。以每秒1個樣品的採集速度對整個384孔板中濃度為100 nM右美沙芬注射液分析的定量結果。

技術

聲波激發進樣

聲波激發進樣平臺已廣泛應用於高通量篩選實驗室，用於在進樣板間快速、準確、精確地傳輸納升體積的液體。聲波用於樣品孔液體中駐波的產生和放大。隨著駐波振幅的增加，液滴從液滴的中心頂點噴出，得到一個液滴（圖2）。這是一個特性鮮明的過程，可以非常嚴格地加以控制，在微秒級的時間內從樣品板孔中的產生恒定體積的液滴。樣品板是標準的384孔或1536孔板，由一對XY步進電動機連接在固定位置的聲學模組上。步進電動機快速地從板子一個孔快速移動到另一孔，依次對每個孔進行取樣。在Echo MS系統中，聲波噴射模組用於在單個噴射脈衝中高重複地產生約2.5 nL的樣品液滴，具體取決於液體的粘度。此外，根據樣品液體的不同，多個噴射週期可以非常快速地依次從200到500 Hz連續運行，因此多個液滴可以有效地合併在一起，從而獲得更大的有效進樣體積

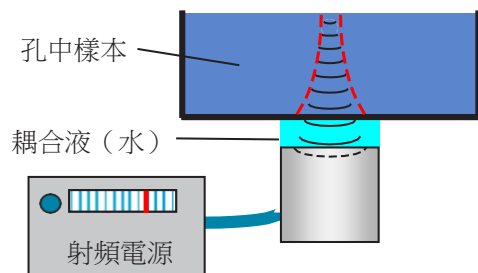


圖2. 聲波激發進樣設備示意圖。

開放式介面

第二個主要組成部分是與橡樹嶺國家實驗室合作開發的開放式介面（OPI），該開放介面可以將聲波噴射的液滴捕獲並傳輸到質譜儀的電噴霧源。OPI是一對同心定位的管，兩端都是開口的（圖3）。外管中的液體（載體溶劑）由低壓液體泵輸送至外管。內管通過傳輸線直接連接到ESI源的毛細管。霧化器氣體（GS1）提供吸氣“拉力”，將從外管輸送的溶劑吸入內管。載體溶劑從外管轉向內管時產生的渦旋是聲波噴射產生的液滴進入液流的地方然後被帶到ESI源。將小尺寸液滴引入液體流的一個優點是，顯著的稀釋有助於大大減小基質抑制作用。

在Echo MS系統上，OPI位置固定在聲學模組上方，樣品板在這些元件之間從一個孔移動到另一個孔。樣品板移動速度非常快，能夠在一秒鐘內對三個孔進行取樣。

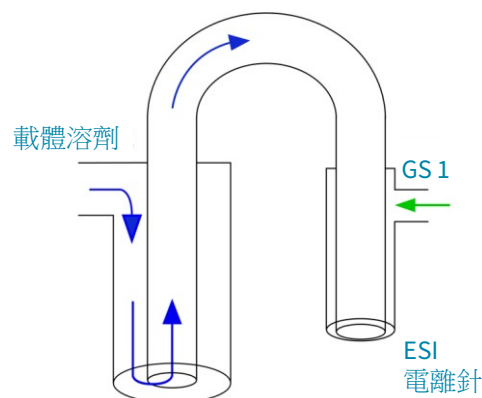


圖3. 開放式介面（OPI）的示意圖。樣品從開放埠介面注入（左），通過毛細管帶到質譜儀的ESI源探針（右）。

質譜分析

最後，使用SCIEX Triple Quad 6500+系統對液體霧化，並對離子化的化合物進行定量。這款質譜儀配有OptiFlow離子源和為OPI專門開發的傳輸線，SCIEX Triple Quad 6500+系統具有業界公認的靈敏度和耐用性，是Echo MS系統進行高通量定量工作的理想檢測器。

軟體與自動化

Echo MS系統不但可以通過SCIEX OS軟體進行操作，作為獨立的分析儀器運行。為單板的高通量定量提供了易於操作的平臺。而且，該系統是專門為集成到現有的高通量環境中而設計的。固定板的位置便於機械臂操作。SCIEX OS軟體具有完善的允許由協力廠商軟體操作控制系統的API。當一個板子分析完成後，系統將生成一個.csv檔，其中包含自動積分的峰面積以及樣品名稱和孔位置。該檔可以由LIMS自動導入。

定量資料生成

分析系統能夠實現真正定量，要執行某些公認的標準。不僅可在一個可用的線性動態範圍內進行準確且可重現的定量，而且在樣品之間無明顯的殘留效應。對於高通量系統，應在所需的快速時間範圍內保證這些特點。為了展示Echo MS系統的功能，使用右美沙芬作為示例化合物，以10%的甲醇水溶液（v/v）稀釋進行了一系列實驗。甲醇作為載體溶劑，MRM方法條件的詳細資訊見表1。

表1. 右美沙芬的MRM詳細資訊。

Q1	Q3	Dwell Time (msec)	DP	EP	CE	CXP
272.1	215.1	100	40	10	31	13

線性和殘留

將右美沙芬以10%的甲醇水溶液按1:1的比例從1000 nM連續稀釋到0.488 nM，然後每孔50 μL轉移到384孔板（貝克曼生命科學384PP 2.0微孔板）中。除標準工作液外，還將純稀釋液以每孔50 μL轉移至板中的其他孔中。校準曲線從高濃度點到低濃度點運行，每個標準品之間運行空白溶劑。用於評估線性和殘留量。

該系統在整個測試範圍內均表現出良好的線性（圖4，表2），儘管低濃度點（0.488 nM）可能沒有足夠高的信噪比，無法視為真正的最低定量限（LLOQ）。更重要的是，即使是高濃度的標準品也沒有殘留（資料顯示無殘留）。

表2. 標準曲線統計結果。

濃度 (nM)	峰面積	準確度
1000	229010	103.1
500	105386	94.9
250	51665	93.0
125	29791	107.3
62.5	15218	109.6
31.25	6360	91.4
15.625	3530	101.3
7.813	1552	88.6
3.906	912	103.5
1.953	384	85.3
0.977	245	106.
0.488	139	115.3

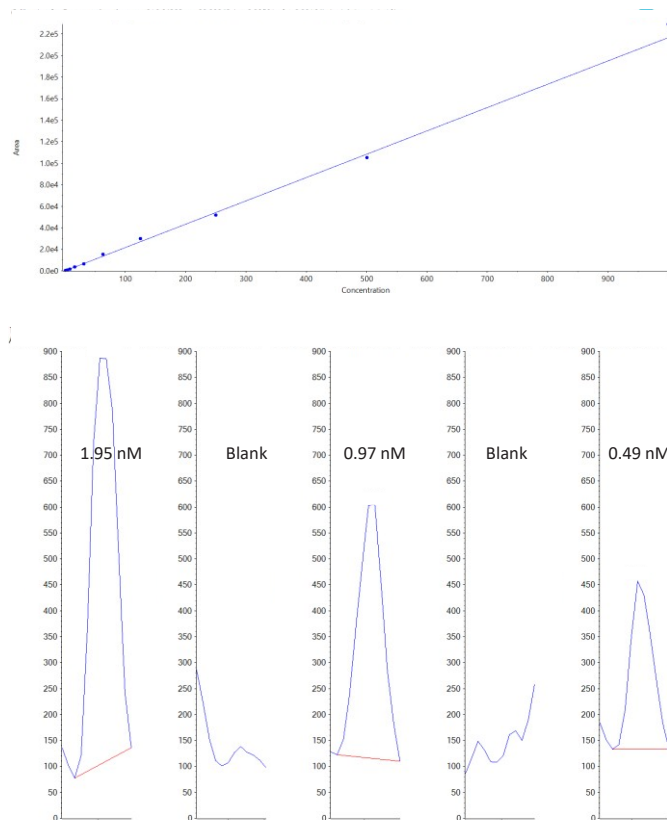


圖4. 評估定量分析的線性和殘留量。（頂部）從高濃度點1000 nM到低濃度點0.488 nM進樣分析的標準曲線。（底部）從標準曲線低濃度點開始進樣分析，中間插有空白溶劑的原始資料。

分析速度和精密度

為了說明系統的固有精度，以每秒一個樣品的速度採集資料，製備了20 mL以10%的甲醇水為溶劑的濃度為100 nM右美沙芬溶液，並將50 mL溶液等體積轉移至 384孔板。僅用了六分鐘，就得到板上每個樣品孔的資料（圖5，詳細資訊見圖1）。使用SCIEX OS軟體對每個孔得到的MRM色譜峰積分。峰面積重現性好，所有384板孔中峰面積的變異係數為1.98%。

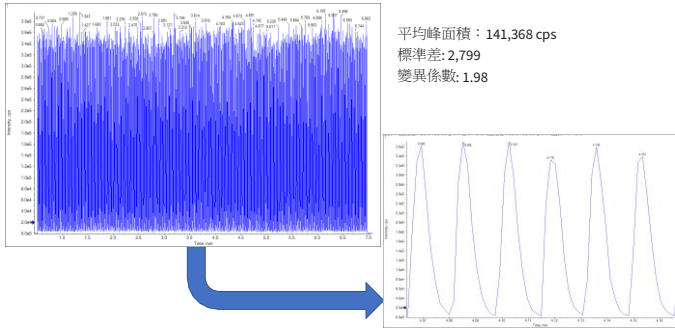
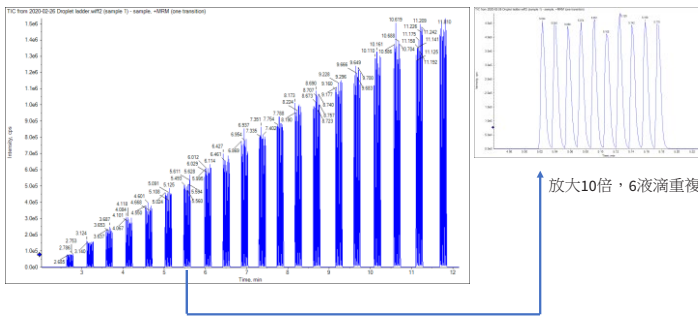


圖5. 384板孔進樣分析的重現性。以1 Hz每個樣品的頻率採集分析整個板上100 nM右美沙芬的溶液。所有的峰面積重現性的變異係數為1.98%。



液滴數 vs 峰面積

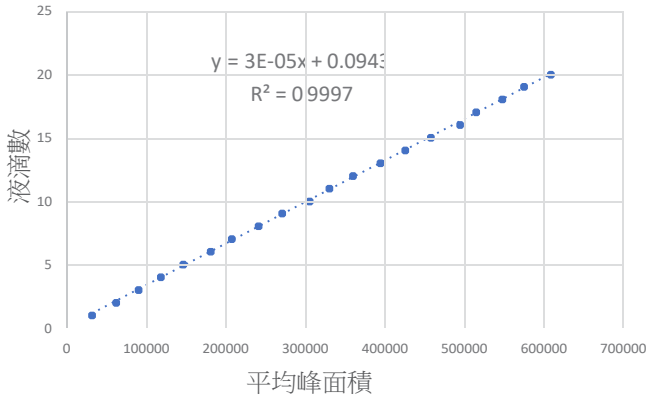


圖6. 進樣的線性。液滴梯度（底部）展示了從1到20個液滴的重現性好的線性回應。液滴梯度上的每個點（頂部）進行10次重複。

定量液滴產生

Echo MS系統的一個有優勢方面是能夠以聲波噴射方法決定分析過程中噴射的液滴數量。液滴的大小取決於聲能頻率和樣品孔中液體粘度之間複雜相互作用。對於給定的液體，應將其視為固定值。由於液滴的產生速度非常快（微秒級），因此可以重複性好的方式噴射多個液滴並轉移到OPI進入質譜儀中作為單次進樣從而增加進樣量。液滴的線性範圍取決於基質，粘性或粘性基質（如未處理的血漿）具有較窄的線性液滴範圍。

為了證明這一特點，我們使用右美沙芬進行了一系列的液滴噴射。液滴數量從一滴到二十滴，形成一個“液滴梯度”（圖6，頂部）。表3列出了在整個液滴梯度中進行10次重複實驗所獲得的平均面積（%CV）。繪製的線性如圖6所示。這個實驗的所有液滴噴射均在單個樣品孔完成。定量控制進樣量的能力類似於常規HPLC工作中的進樣體積，在方法開發過程中非常有用。

表3. 液滴梯度統計學結果。

液滴數	平均峰面積	變異係數
1	31013.2	1.10
2	61849.6	2.41
3	89629.1	2.51
4	118421.0	2.69
5	146231.9	1.75
6	181091.6	2.01
7	207362.9	2.31
8	240954.0	1.91
9	270286.5	1.84
10	305316.6	1.47
11	330220.0	1.80
12	359994.5	1.60
13	394398.1	1.98
14	425327.8	1.44
15	457841.7	1.82
16	495142.4	0.76
17	514707.9	2.45
18	548093.9	2.07
19	575179.7	1.95
20	608447.0	2.43

結論

新開發的聲波激發與質譜耦合 (AEMS) 系統-SCIEX Echo MS系統-具有非常大地改變高通量分析領域的潛力：

- 定量ESI MS/MS分析速度現在已接近讀板儀，且保持了方法開發的簡便性，同時監測多種分析物的能力，質譜好的特異性和寬的動態範圍的特點。
- 表現出好的進樣重現性（所有384孔板孔的CV為1.98%）。
- 系統的硬體和軟體均為高通量環境而設計。樣品板固定器的放置方式使得標準機械手可以輕鬆地將板轉移至樣品板。開放的API允許控制軟體控制系統，而無需人工干預。
- 資料處理和匯出也可實現自動化。在獲取板的資料之後，使用定量方法對其進行處理。處理結果將自動生成一個.csv檔，包括孔號，峰面積和樣品名稱等資訊，這些資訊可以通過LIMS導入。

SCIEX臨床診斷產品線僅用於體外診斷。僅憑處方銷售。這些產品並非在所有國家地區都提供銷售。獲取有關具體可用資訊，請聯繫當地銷售代表或查閱<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他產品僅用於研究。不用於臨床診斷。

本文提及的商標和/或註冊商標，也包括相關的標識、標誌的所有權，歸屬於AB Sciex Pte. Ltd. 或在美國和/或某些其他國家地區的各權利所有人。Echo 和 Echo MS是屬於美國或在其他國家地區的Labcyte, Inc.的商標或註冊商標，該商標經許可使用。所示圖像僅用於說明目的，可能不是產品和/或技術的精確表示。樣品盤可以從貝克曼庫爾特生命科學事業部購買。Beckman Coulter[®]商標經許可使用。

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-11385-ZH-A. AB SCIEX[™] 商標經許可使用。



Accelerated pharmacokinetic profiling and metabolite monitoring Using Echo[®] MS System

Acoustic Ejection Mass Spectrometry

Neil Devenport¹, Neil Walsh¹, Simon Wood²

¹SCIEX UK, ²Cyprotex Discovery UK

The generation of clearance profiles and calculation of intrinsic clearance (CL_{int}) values is an important stage in pre-clinical drug discovery.¹ The pharmacokinetic (PK) assessment of potential drug candidates is typically performed by a time-course incubation with human liver microsomes (HLM) before LC-MS analysis. The *in vitro* CL_{int} can be scaled to *in vivo* and used to predict human clearance which can be then used to inform dosing studies, as well as provide insight into enzymes responsible for metabolism of drug candidates.

As the process is performed during the early stage of drug discovery, the number of potential candidates can still be in the thousands, or even tens of thousands, and CL_{int} values will need to be calculated for each target. This will require multiple time-points for each target leading to a large analytical demand. This creates a significant bottleneck using current LC-MS solutions.

The Echo MS System using Acoustic Ejection Mass Spectrometry (AEMS) provides a sample introduction method capable of analyzing 1 sample per second and up to 3 samples per second when multiplexed.² With the Echo MS System, very small, reproducible droplets can be ejected from high-density well plates, and this ejection process is compatible with the wide range of solutions and complex matrices used in drug discovery. The ejected droplets are then captured by the Open Port Interface (OPI) device which uses a laminar flow of carrier



solution that dilutes and transports the sample to the electrospray source, where it is ionized by conventional electrospray (Figure 2).² This process forms a contactless sample introduction method with minimal carry-over and minimal matrix effects.

Here, the utility of this high-throughput solution was explored for use in candidate screening. The goal was to highlight the ability of the Echo MS System to alleviate the analytical bottleneck of traditional LC-MS solutions through speed and quantitative performance, and show how that correlates with current Cyprotex methodology.

Key features of the Echo[®] MS System

- Rapid sample analysis using Acoustic Droplet Ejection and Open Port Interface:
 - One sample per second for a single analyte, up to three samples per second in multiplex mode
 - Highly reproducible sample injection
 - Extremely low potential for carryover
- Broad compound coverage using electrospray ionization featuring the OptiFlow[®] Turbo V Ion Source for robust and efficient ionization
- Industry proven high sensitivity and quantitative robustness using the SCIEX Triple Quad[™] 6500+ LC-MS/MS System
- Ease of operation using SCIEX OS Software
- Purpose built for incorporation into HTS workflows
 - Sample plate tray can be accessed by most robotic arms
- Open software API for incorporation of platform into existing automated HTS environments

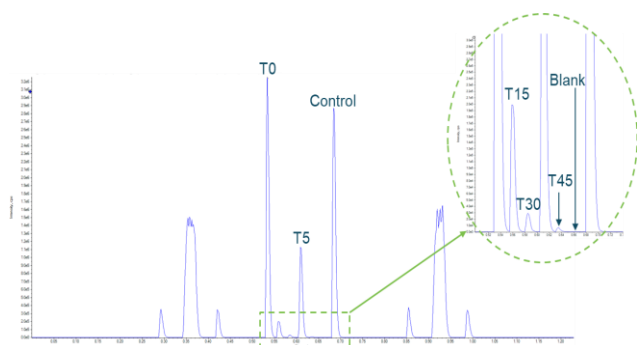


Figure 1. Microsomal incubation of buspirone. Example data using the Echo MS System were obtained from a microsomal incubation of buspirone with data acquired from 5 timepoints, a control and a blank reference, all completed in under 90 seconds. Sampling was done in a serpentine manner from the 384-well plate.

Methods

Sample preparation: Microsomal incubations were performed in human liver microsomes (0.1M phosphate buffer, 0.5 mg/mL) initiated with NADPH (1mM) for 39 traditional small molecule APIs (1μM) and quenched in acetonitrile at 0, 5, 15, 30 and 45 time-points. These same samples were split for LC-MS analysis and Echo[®] MS System analysis.

Acoustic ejection: The Echo MS System was operated using 70% acetonitrile with 2mM ammonium formate and 0.1% formic acid at a flow rate of 450 μL/min. A total ejection volume of 25 nL was employed for each acoustic event at a frequency of 1.5 Hz.

Mass spectrometry: The SCIEX Triple Quad 6500+ System was operated in MRM mode monitoring a single transition with a total analytical cycle time of 100 msec. The ESI source was operated at 500 °C with a capillary voltage of 5500 V and the GS1/GS2 gas flows at 90 and 50 psi, respectively.

Data processing: SCIEX OS Software 1.6 was employed for the optimization of the target MRM transitions, automatic integration of the MS peaks and the automatic creation of the results file and associated .txt file for LIMS integration.

Results

The Echo MS System is specifically calibrated to eject droplets of 2.5 nL per acoustic event. The effective ejection volume can be increased by firing multiple 2.5 nL droplets at a high frequency (20 Hz), which the MS system detects as a single peak. The process allows the user to optimize analytical sensitivity versus the matrix effects, because of the “larger”

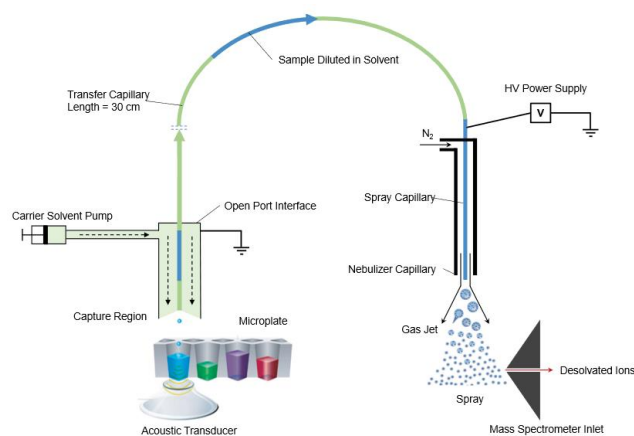


Figure 2. System schematic. Schematic of the Echo MS System showing the acoustic ejection of sample droplets and their capture and transfer to the OptiFlow Source by the OPI.

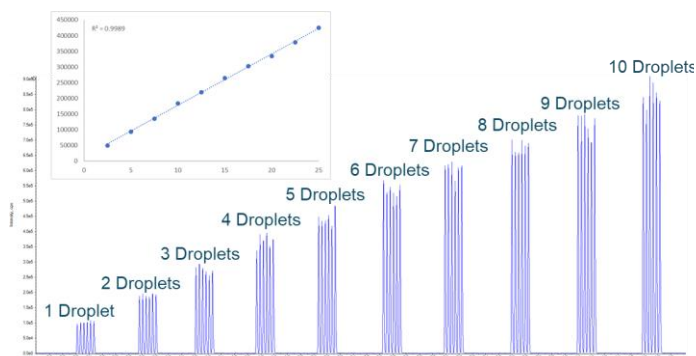


Figure 3. An example AEMS droplet ladder for lidocaine ranging from 1-10 droplets per MS measurement, equivalent to ejection volumes of 2.5-25 nL. The calibration line shown in insert with linear R^2 value >0.998 .

ejection volumes. Figure 3 shows this process using lidocaine as the target analyte.

The “droplet ladder” shown in Figure 3 shows the typical response obtained from the Echo MS System producing peak widths of approximately 400 msec at 50% peak height. These sharp peaks enable the 1 sample per second acquisition rates.

To assess the quantitative performance of the Echo MS System, solvent standard calibration lines for each of the 39 analytes were created across a target concentration range of 0.01-100nM. The AEMS analysis of the solvent standard calibration line was performed using an ejection volume of 25 nL. This will allow maximum analyte sensitivity from the non-complex solvent

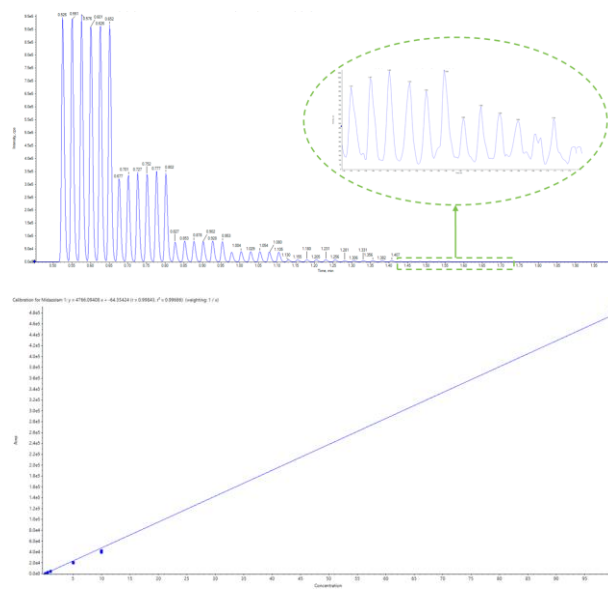


Figure 4. Concentration curve for Midazolam. (Top) Midazolam ejection peaks across the concentration range of 100-0.05nM ran from high to low with $n=6$ technical replicate ejections from each well position. (Bottom) Linear regression for midazolam ejections show good quantitative performance ($R^2 >0.99$).

Table 1. Quantitative performance of the Echo MS System for six representative marketed drugs (0.01-100nM).

Compound name	MRM transition (Q1-Q3)	Calibration range (nM)	Regression value (R2)	Accuracy >LLOQ/@LLOQ	%CV >LLOQ/@LLOQ
Acetaminophen	152-110	1-100	0.994	108% / 97%	6% / 7%
Codeine	300-165	0.5-100	0.996	105% / 94%	3% / 18%
Diphenhydramine	256-167	0.1-100	0.991	95% / 98%	2% / 17%
Midazolam	326-291	0.05-100	0.996	93% / 100%	3% / 11%
Zolpidem	308-235	0.01-100	0.998	98% / 105%	2% / 20%

standard solution. Figure 4 shows example data for midazolam across the calibration range.

Following the quantitative testing, the clearance profiles for each of the target analytes were determined. In all cases, a single MRM transition was monitored with no internal standard used. The timepoints provided were 0, 5, 15, 30, 45 min. The peak

area values obtained from the analysis of T0 were set to 100% parent response, and the following time-points were provided as % parent remaining. Figure 5 provides three clearance regression profiles showing a range of clearance profiles.

Using the gradient of the clearance profiles, the elimination rate constant (k) and compound half-life ($t_{1/2}$) can be determined. The CL_{int} values for each of the target APIs can be calculated using the following equation

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

$$CL_{int} (\mu L / min / mg) = \frac{0.693}{t_{1/2}} \times \frac{\mu L \text{ of incubation}}{mg \text{ microsomes}}$$

Where; k = calculated elimination rate constant

A strong correlation ($r^2= 0.985$) of calculated CL_{int} is observed between the Echo MS System data and LC-MS data (Figure 6).

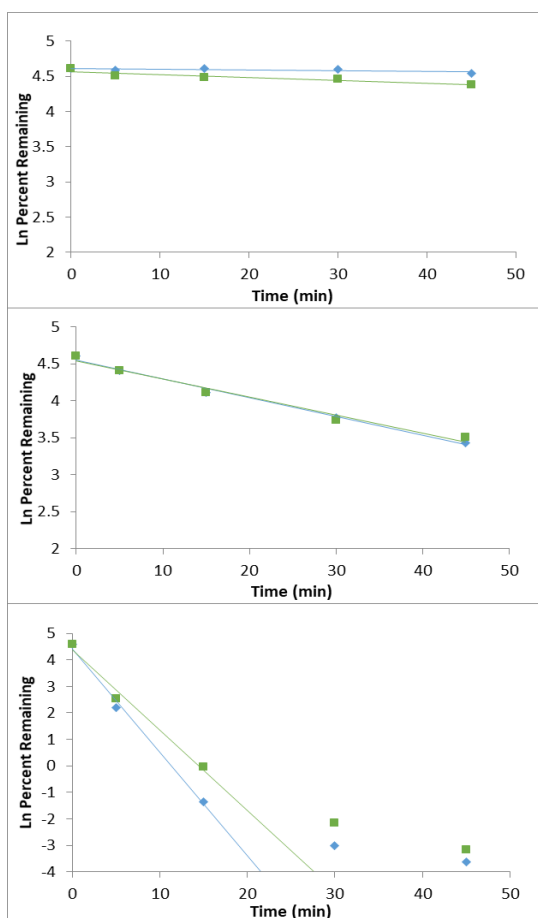


Figure 5. Clearance profiles. Clearance profiles for prazosin (top), erythromycin (center) and amodiaquine (bottom) are shown. The rapid acquisition approach using Echo MS System is shown as the blue trace vs. the same samples run with standard LC-MS analysis shown in the green trace.

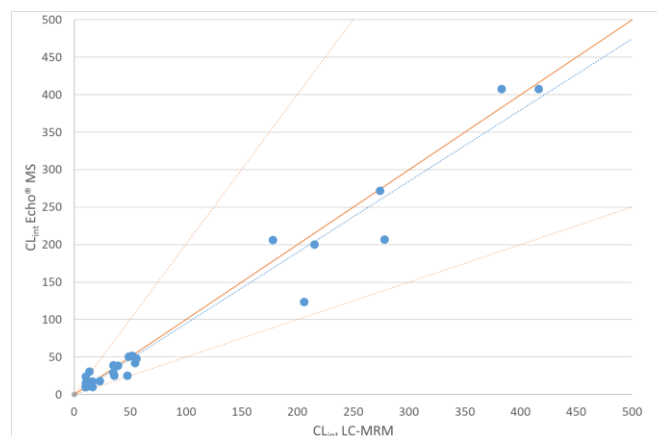


Figure 6: Correlation analysis of Echo MS System data with LC-MRM data. Blue dotted line represents correlation, solid orange is the line of unity, dashed orange line is +/- 2-fold of unity. CL_{int} values below the assay level of quantification for the assay (<10.3 $\mu L/min/mg$ equivalent to $t_{1/2}$ of 3*incubation time) have been excluded.

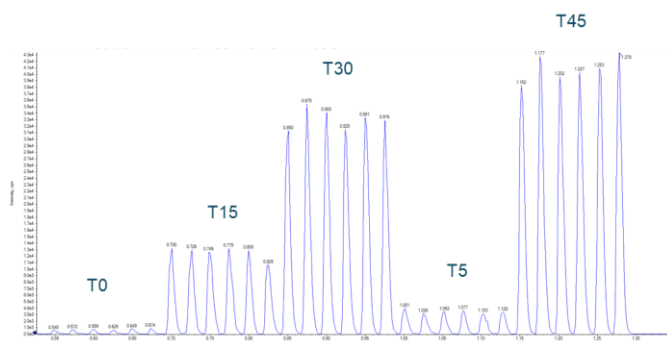


Figure 7. Incubation time course. Echo MS System data monitoring hydroxy-imipramine over the incubation time course with n=6 replicate measurements per time point.

The data spans a range of clearance values and is scattered around the line of unity.

In addition to the clearance information, the ability to monitor suspected or known metabolites in a rapid manner might also be of benefit during late-discovery phase. The ability of the Echo MS System to provide this data was tested by repeating the measurement of the imipramine incubation with the additional MRM transition of the known hydroxy metabolite (297.1→86.1). The MS data produced from this scan is provided in Figure 7.

This metabolism data can then be related back to the clearance of the parent imipramine molecule (Figure 8) providing the analyst with DMPK information in rapid time frames suitable for the high through-put environment.

Conclusions

The data presented here confirms the viability of the use of the Echo MS System for early discovery phase studies providing DMPK data in seconds as opposed to the hours required when using traditional LC-MRM based scanning methodologies. The data generated from the Echo MS System was quantitative, with excellent %CV and accuracy values. The technology also provides clearance information with good agreement between AEMS and traditional LC-MS, as well as high-throughput metabolite monitoring, allowing decisions on candidate progression to be made quickly and accurately.

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries. Echo and Echo MS are trademarks or registered trademarks of Labcyte, Inc. in the United States and other countries, and are being used under license. The images shown may be for illustration purposes only and may not be an exact representation of the product and/or the technology. Plates are available from Beckman Coulter Life Sciences. Beckman Coulter® is being used under license. © 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-12894-A. AB SCIEX™ is being used under license.

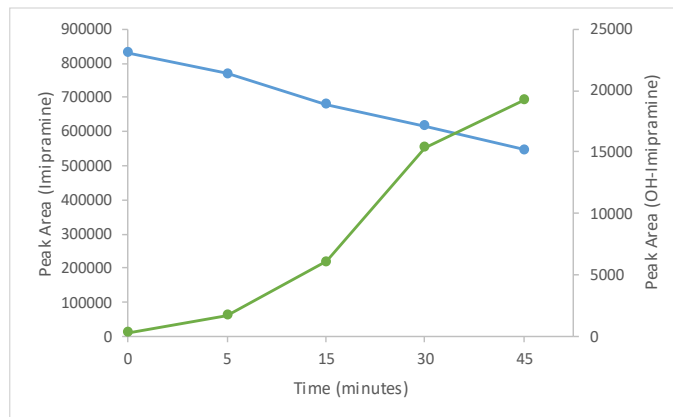


Figure 8. Clearance of imipramine. Clearance of imipramine parent (blue) overlaid with detection of hydroxy-imipramine metabolite (green) across the incubation time scale.

References

1. Chao P, Uss AS, Cheng KC. (2010) Use of Intrinsic Clearance for Prediction of Human Hepatic Clearance, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, **6(2)**, 189-98.
2. Rapid MS/MS analysis with Acoustic Ejection Mass Spectrometry (AEMS). SCIEX technical note, RUO-MKT-02-11385-A.



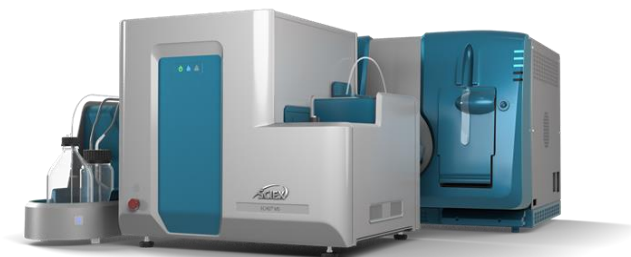
Ultra-fast, accurate and simultaneous quantification of ritonavir and lopinavir in human plasma

Sensitive and robust results using the Echo® MS System

Rahul Baghla, Rolf Kern
SCIEX, USA

Protease inhibitors (PIs) are a class of anti-viral drugs that prevent viral replication by selectively binding to viral proteases and inhibiting their function. The development of PI-based therapies has been of enormous benefit to people infected with HIV. Used in combination with other drugs, PIs have dramatically reduced the number of people who become ill from HIV-related opportunistic infections or who die from AIDS.

Unfortunately, the effectiveness of protease inhibitors can fade over time. Mutations during viral replication can result in viruses that produce new, different proteases that are not targeted by current PI therapies¹. The best way to avoid this drug resistance is to reduce or stop HIV replication. With less HIV replication, there is less of a chance of a new strain that is resistant to anti-HIV drugs. To keep HIV levels as low as possible, PIs are typically taken in combination with at least two other anti-HIV drugs. Such combination therapies are referred to as highly active antiretroviral therapy (HAART)².



Lopinavir and ritonavir are two protease inhibitors that are often used as part of a fixed-dose combination, and serve as the model compounds in this study.

Acoustic Ejection Mass Spectrometry (AEMS), as implemented in the Echo® MS System with a SCIEX Triple Quad™ 6500+ LC-MS/MS system, offers clear benefits for quantification of lopinavir and ritonavir in human plasma. Requiring minimal sample preparation and no chromatographic separation, it provides high sample throughput without sacrificing robustness or reproducibility. The Echo® MS System combines Acoustic Droplet Ejection technology with an Open Port Interface (OPI) to deliver nanoliter sample volumes with minimal carryover. The small sample size reduces matrix suppression and facilitates easy sample preparation.

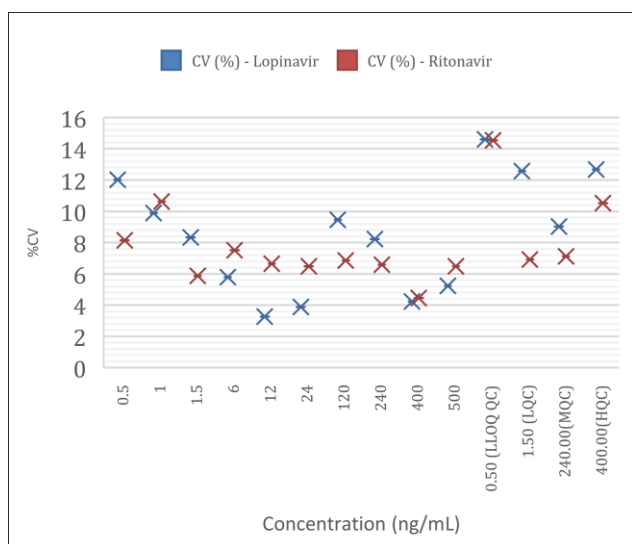


Figure 1. High reproducibility in quantification. 6 replicates at each concentration level of lopinavir and ritonavir in extracted human plasma, along with 6 replicates at quality control levels, showed excellent %CVs, below 15% at all levels.

Key features of the Echo® MS System for high-throughput bioanalysis quantification

- Ultra-fast 3 sec/sample analyses provide high throughput for quantifying large number of samples
- Liquid-liquid extraction (LLE) sample preparation ensures excellent quantitative accuracy
- Exceptional sensitivity of the Echo® MS System yields high quality data at all concentration levels

Experimental details

Sample preparation: Lopinavir and ritonavir (Sigma Aldrich) were spiked into human plasma (BioIVT) samples in the range of 0.5 ng/mL to 250 ng/mL each. Samples were processed using a liquid-liquid extraction method as follows. 0.5 mL of di-isopropyl ether was added to 0.1 mL aliquots of spiked plasma. Samples were vortexed for 1 minute followed by centrifugation at 12,000 rpm for 5 minutes. 0.4 mL of supernatant liquid was collected and dried under a nitrogen stream. Samples were reconstituted in 100 μ L of 25% v/v methanol in water and transferred to a 384-well plate for analysis by AEMS. Plates are available from Beckman Coulter Life Sciences.

Acoustic ejection method: Methanol with 0.1% v/v formic acid was used as carrier solvent at a flow rate of 425 μ L/min. 50 nL sample volumes were ejected into mass spectrometer for analysis.

Mass spectrometry: The Echo[®] MS System included a SCIEX Triple Quad 6500+ LC-MS/MS system and was controlled by SCIEX OS Software 1.6.10. The optimized MS parameters are listed in Table 1.

Table 1. Optimized MS parameters.

Name	Q1 / Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Ritonavir	721.3/296.1	30	28	10
Lopinavir	629.3/447.2	30	22	10
Source parameters	Value	Source parameters	Value	
Curtain gas (psi)	25	CAD gas (psi)	10	
Ion source gas 1 (psi)	90	Ion spray voltage (V)	5000	
Ion source gas 2 (psi)	70	Source temperature (°C)	350	

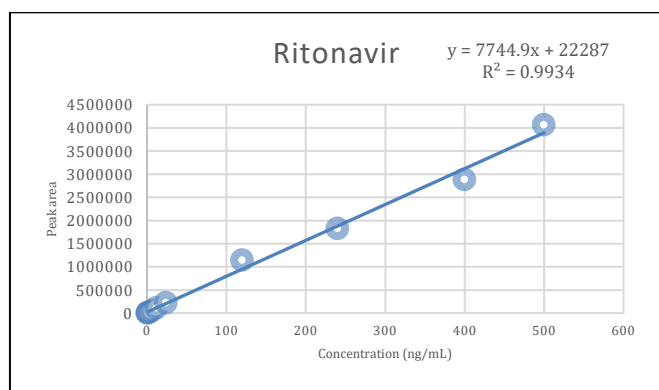


Figure 2. Calibration curve for quantification of ritonavir in human plasma using the Echo[®] MS System. Good linearity and reproducibility were observed for the samples ejected in six replicates at each concentration level.

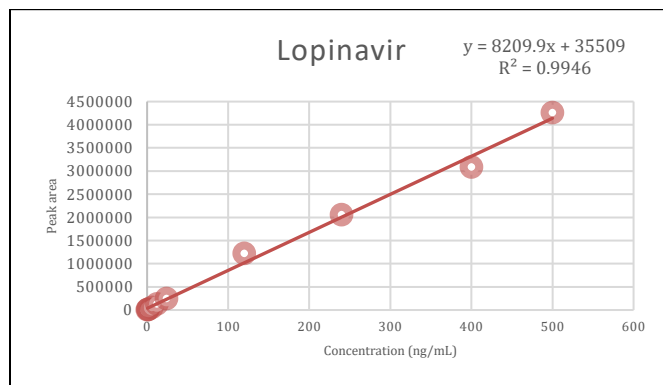


Figure 3. Calibration curve for quantification of lopinavir in human plasma using the Echo[®] MS System. Good linearity and reproducibility were observed for the samples ejected in six replicates at each concentration level.

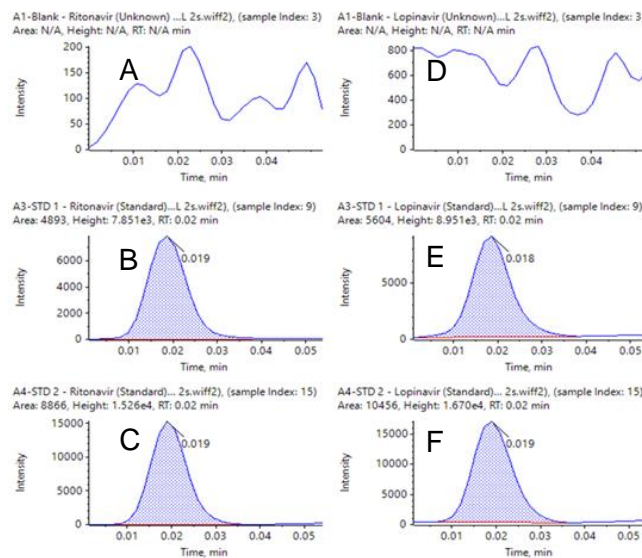


Figure 4. XICs for transition for ritonavir and lopinavir using the Echo[®] MS System. Blank, 0.5 ng/mL and 1.5 ng/mL (A,B,C for ritonavir and D,E,F for lopinavir, respectively) are shown.

Results

Samples for the calibration curves, along with quality control samples, all analyzed in six replicates, demonstrated the high reproducibility of AEMS when combined with liquid-liquid extraction. Excellent %CVs were achieved across all concentration levels with no interference in blank human plasma samples (Figure 1). Even at the extremely short analysis time of 3 seconds per sample, the method yielded LLOQs of 0.5 ng/mL for both lopinavir and ritonavir. As summarized in Tables 2 and 3, the assay accuracy was 85.31–112.34% for ritonavir and 85.51–113.52% for lopinavir. Accuracies and %CVs were well within standard acceptance criteria for all tested samples. The

Table 2. Quantification summary for ritonavir analysis by the Echo® MS System.

Actual Concentration (ng/mL)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	CV (%)	N
0.50	0.49	97.37	8.15	6
1.00	1.06	106.14	10.63	6
1.50	1.48	98.51	5.86	6
6.00	5.56	92.66	7.51	6
12.00	13.24	110.31	6.64	6
24.00	26.72	111.34	6.49	6
120.00	134.81	112.34	6.86	6
240.00	215.70	89.88	6.58	6
400.00	341.23	85.31	4.46	6
500.00	480.76	96.15	6.49	6
Quality Control				
0.50 (LLOQ QC)	0.46	91.68	14.55	6
1.50 (LQC)	1.45	96.36	6.91	6
240.00 (MQC)	248.37	103.49	7.12	6
400.00 (HQC)	429.18	107.30	10.52	6

Table 3. Quantification summary for lopinavir analysis by the Echo® MS System.

Actual Concentration (ng/mL)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	CV (%)	N
0.50	0.50	100.02	12.02	6
1.00	1.01	101.05	9.88	6
1.50	1.46	97.35	8.33	6
6.00	5.68	94.62	5.79	6
12.00	13.62	113.52	3.26	6
24.00	26.49	110.37	3.89	6
120.00	133.63	111.36	9.46	6
240.00	225.31	93.88	8.23	6
400.00	342.02	85.51	4.23	6
500.00	466.56	93.31	5.24	6
Quality Control				
0.50 (LLOQ QC)	0.49	98.51	14.61	6
1.50 (LQC)	1.41	94.31	12.57	6
240.00 (MQC)	242.70	101.13	9.02	6
400.00 (HQC)	416.81	104.20	12.68	6

calibration curve covered approximately 3 orders of magnitude (0.5–250 ng/mL) for both analytes and displayed linearity with regression coefficients (r^2) of 0.9934 for ritonavir and 0.9946 for lopinavir using a weighting of $1/x^2$ (Figures 2 and 3).

Samples were analyzed without internal standards for this assay. Use of labeled internal standards might further improve these results.

Conclusions

- The Echo® MS System produced very sensitive, accurate and reproducible results for the simultaneous quantitative analysis of lopinavir and ritonavir in human plasma
- The very short analysis time (3 sec/sample) enabled rapid generation of quantitative data for high numbers of samples
- The assay showed great reproducibility without using labeled internal standards, but use of labeled internal standards is recommended to further improve these results

References

1. Koehn J, Ho R.JY. (2021) Novel Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Detection of Anti-HIV Drugs Lopinavir, Ritonavir, and Tenofovir in Plasma. *[Antimicrobial Agents and Chemotherapy](#)*, **58** (5), 2675-2680.
2. Mishra TD, Kurani H, Singhal P, Shrivastav PS, (2012) Simultaneous Quantitation of HIV-Protease Inhibitors Ritonavir, Lopinavir and Indinavir in Human Plasma by UPLC-ESI-MS-MS, *[Journal of Chromatographic Science](#)*, **50** (7), 625-635.
3. Jaiswal S, Sharma A, Shukla M, Lal J, (2017) Simultaneous LC-MS-MS Determination of Lopinavir and Rifabutin in Human Plasma, *[Journal of Chromatographic Science](#)*, **55** (6), 617-624.

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Echo and Echo MS are trademarks or registered trademarks of Labcyte, Inc. in the United States and other countries, and are being used under license. Other trademarks and/or registered trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries.

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13058-A. AB SCIEX™ is being used under license.



Headquarters

500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA
Phone 508-383-7700
sciex.com

International Sales

For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at sciex.com/offices

使用Echo™ MS系統進行真正的高通量生物分析

利用聲波激發與質譜耦合技術可以快速進行樣品分析，大大縮短了生物分析研究的週期

Rolf Kern¹, Chang Liu²

¹ SCIEX, USA, ² SCIEX, Canada

分析生物樣品以評估候選藥物的藥代動力學（PK）特點是幾乎所有製藥公司都要例行進行的基礎分析。儘管藥物的藥代動力學資訊在藥物發現和開發中具有重要意義，但生物分析資料的獲得需要花費大量時間。通常要對多個研究物件的許多單獨的時間點進行分析，從而生成每個化合物的資料。考慮到製備樣品的時間，即使只是使用簡單的蛋白質沉澱製備方法，再加上最快速的情況下也需要1到2分鐘的分析時間，那麼生物分析研究工作通常也要到第二天才能獲得資料。

SCIEX Echo™ MS系統，採用聲波激發液滴噴射技術，通過開放式探針介面連接到高靈敏度的 SCIEX Triple Quad™ 6500+ 系統，能夠顯著縮短分析時間，同時降低了樣品製備的需求。這使得藥代動力學研究資料可以在樣本製備的當天獲得，使研究人員更快地獲得這一重要資料（圖1）。

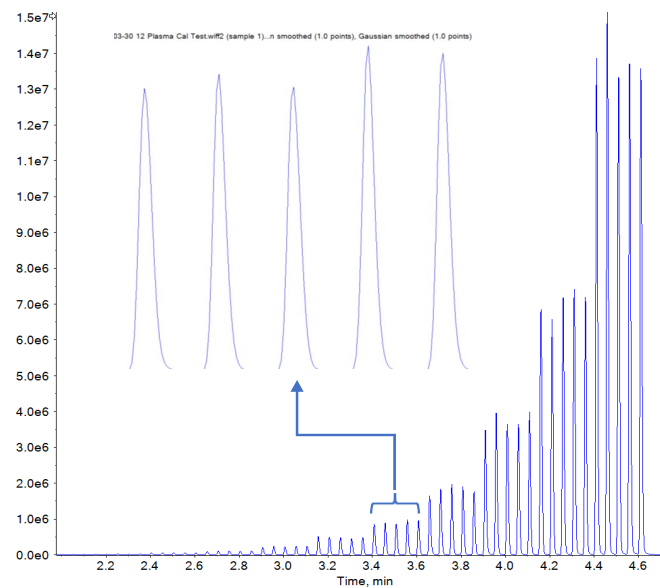


圖1. 5分鐘內完成完整的血漿藥代動力學研究。在不到5分鐘的時間內，可以產生一條芬太尼未經處理的血漿標準曲線，包含16個不同血漿濃度點，每個濃度點重複5次。

合適的樣品製備方法的選擇通常需要平衡靈敏度、通量以及耗材的成本（例如固相萃取柱的消耗）等因素。對於靈敏度比較容易滿足要求的生物分析來說，更快的分析速度和更簡單的樣品製備方法可以使整個的樣品分析過程更高效。在此，結合SCIEX Echo™ MS系統我們開發了非常簡單的樣品製備技術，以快速完成常規生物分析研究。

使用Echo™ MS系統進行常規生物分析的主要特點

- Echo™ MS系統與高靈敏度的SCIEX Triple Quad 6500+系統結合在一起，可以滿足生物分析的靈敏度要求
- 使用三種不同的簡單的樣品製備方法均達到了較好的定量限，滿足許多常規生物分析的通量和成本需求
- 即使在未經處理的血漿樣品中也可以獲得很好的分析重現性
- Echo™ MS系統超高的分析速度、較低的系統殘留再結合簡單的樣品製備方法，逐漸形成一個高效的、專用的生物樣品分析平臺

方法

樣品製備： 芬太尼（Cerilliant公司）工作標準品採用10%的甲醇水溶液從65.536 mg/mL以1:1稀釋比例連續稀釋至0.002 mg/mL。以諾芬太尼（Cerilliant公司）為內標，用10%甲醇水溶液稀釋至200 ng/mL。

將10 µL 的待測物工作溶液和10 µL的內標工作溶液添加到200 µL 帶有K2EDTA抗凝劑的SD大鼠血漿中。同時大鼠血漿中分別添加0.1%和0.01%體積比的PEG400（Sigma）製備如上相同的標準品樣品。

蛋白質沉澱： 將100 µL製備好的血漿樣品轉移到錐形底部96孔板中。向每個標準血漿樣品中加入100 µL甲醇，蓋住96孔平板並在軌道平板振動篩上振搖混合5分鐘。將96孔平板以4000 rpm/min 離心10分鐘以達到蛋白沉澱的效果。將60 µL上清液轉移至Echo 384孔板（貝克曼生命科學384PP 2.0微型板）進行分析。

1:1稀釋： 取30 µL製備好的血漿樣品轉移至Echo 384孔板中。然後每個樣品中各加入30 µL水，並在軌道振動篩上將384孔板振搖混合5分鐘。

未處理血漿： 將60 µL製備的血漿樣品轉移至Echo認證的 384孔聚丙稀2.0微孔板中（384PP 2.0）。

在樣品分析之前，最終的樣品進樣板以3000 rpm/min的速度離心以去除進樣孔內的氣泡，然後在軌道振動篩上振搖混合以確保在每個樣品孔內形成穩定的液面。

質譜分析： 使用SCIEX Triple Quad 6500+系統，採用表1中列出的參數，以正離子模式採集MRM資料。關鍵離子源參數如表2所示。注意在分析中，GS1的值是90，這個值需要比通常使用時要高一些，因為GS1或霧化氣流提供了引力，將載體溶劑從開放式探頭介面帶入離子源。

表1. MRM參數

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

表2. 離子源參數設置

參數	設置
GS 1	90
GS 2	70
CUR	30
CAD	12
Temp	350
IS	5000

聲波激發液滴進樣法： 聲波激發液滴進樣法在 Echo™MS系統中相當於液質聯用系統中的高效液相色譜進樣系統，其參數相對較少。

流速一般基於載體溶劑的粘度進行設置，本研究採用的是純甲醇作為載體溶劑。

溶劑類別將基於樣品液體的粘度來進行選擇；粘度小於水的樣品液體使用SP類型，粘度等於或大於水的樣品液體使用AQ類型。

對於極“髒”的 基質樣本可以在採集方法中設置延遲時間，從而使得兩針樣品進樣之間有足夠的採集時間獲得穩定的基線水準。對於生物樣品分析工作，增加額外的1000 ms延遲時間，以確保高濃度樣品進樣後不會提高後續低濃度樣品的基線。而對於基質為水或有機溶劑的樣品通常不需要這樣做。

液滴數是指很短的時間內連續脈衝一次激發進樣的液滴數量，類似於高效液相色譜進樣系統中的進樣體積。進樣的最佳液滴數取決於樣品基質和所需的靈敏度。複雜的基質採用較高的進樣液滴數反而會出現回應的降低，因為基質抑制效應和峰展寬效應抵消了更多的進樣液滴數帶來的分析物回應的提升。更乾淨的基質通常可以顯著提高靈敏度（在一些情況下液滴數可以提高到20滴）。在進行分析方法開發時，進行不同液滴數的優化有助於選擇最佳進樣液滴數。

圖2展示了對蛋白沉澱標準曲線進行進樣液滴數優化的實驗結果。在圖2中，我們可以看到當進樣液滴數在1到5個液滴時，待測物信號成線性增加，進樣液滴數在8到9個液滴時，信號回應趨於平穩。因此這種基質類型樣品最終選擇了8個進樣液滴數。

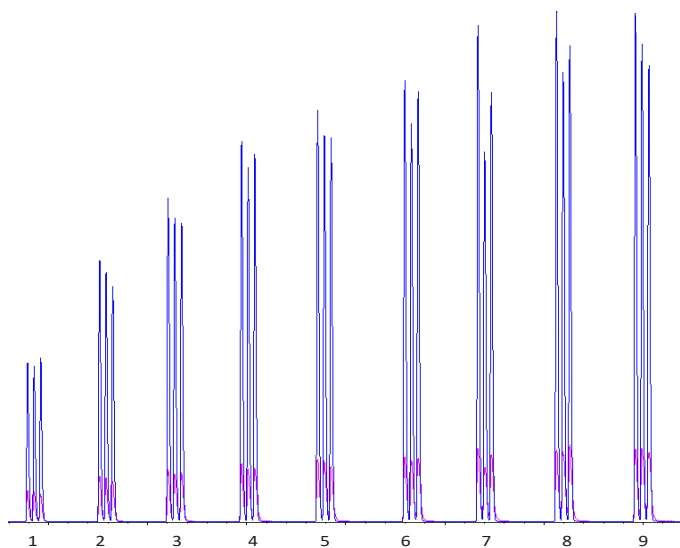


圖2.蛋白質沉澱方法製備樣品的液滴數優化結果。在分析開發過程中進行進樣液滴數優化可以平衡待測物的信號回應和基質效應。這裡x軸是芬太尼蛋白沉澱血漿樣品的進樣液滴數（每個液滴數重複進樣3次）。8個液滴數是該實驗確定的最佳液滴數。

表3列出了三種不同樣品製備方法對應的聲波激發進樣的方法參數。

表3. 聲波激發進樣方法參數

參數	血漿	1:1稀釋	蛋白沉澱法
流速	350	350	350
流體類型	AQ	AQ	SP
延遲時間	1000 ms	1000 ms	1000 ms
液體數量	5	4	8

資料處理：一旦一個分析批的採集完成，一個拆分演算法檔就會自動運行，這個檔是在採集的.wiff2檔時創建的單獨文件，.wiff2檔可以在SCIEX OS 軟體分析模組中處理。在高通量情況下，可以由LIMS或其他軟體進行計算，如果在批次處理中指定了處理方法，則可以自動生成峰面積。在本實驗中，資料的處理與分析模組中的標準生物分析資料相同。

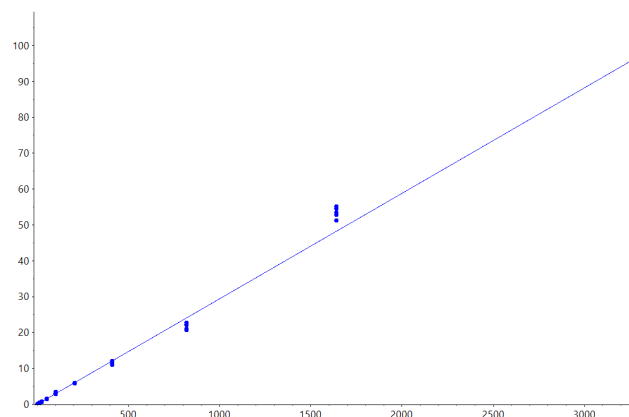


圖3.芬太尼未經處理血漿樣品標準曲線示例。未經處理血漿樣品中芬太尼濃度從X到Y ng/mL的標準曲線，每個濃度水準重複採集5次。

不同樣品製備方法的靈敏度

研究了三種不同的樣品製備方法來考察基質複雜度對生成資料品質的影響。每種樣品製備方法均採集芬太尼的濃度曲線，考察定量下限（LLOQ）、線性和重現性。圖3顯示了芬太尼在未經處理血漿中的曲線示例。在最低濃度樣品進樣之前先進空白樣品，以確定最低定量限（圖4）。總的來說，未經處理的血漿中獲得的資料最好。

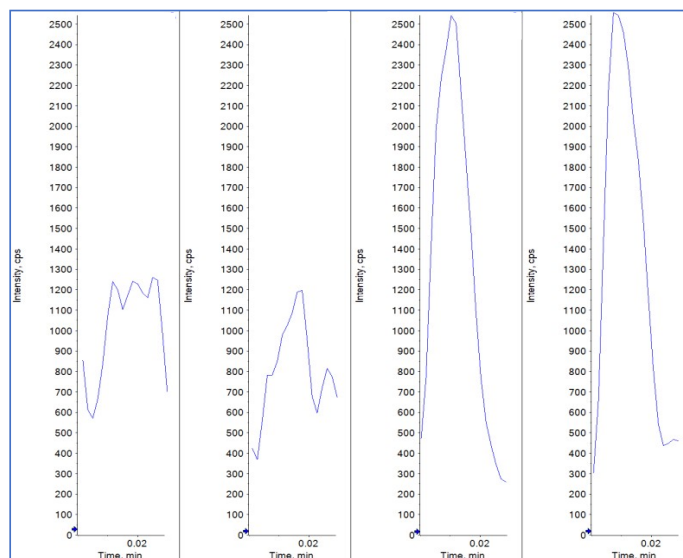


圖4. 芬太尼定量下限信號回應。0.2 ng/mL未經處理芬太尼血漿標準添加樣品進樣後採集空白樣品，結果顯示最低定量限樣品具有較好的信號回應。

表4. 每種樣品製備方法製備的標準曲線的重現性。變異係數是每個濃度水準重複採集5次計算所得，大多數濃度水準的變異係數均低於5%。

標準品濃度	血漿	血漿:水	蛋白沉澱法
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

* 代表標準添加樣品在採集過程中資料丟失；
BLOQ代表低於定量限；

無論使用哪種樣品製備方法，標準曲線上的每個濃度點重複進樣的平均準確度均應在標示值的85%-115%。採用不同樣品製備方法得到的所有濃度水準的重現性如表4所示。值得注意的是，在分析靈敏度和變異係數方面，三種不同的樣品製備方法不存在顯著性差異。

基質抑制效應的評估

除了靈敏度、重現性和線性外，蛋白基質的抑制效應還可以通過分析血漿中標準添加PEG400來考察，在資料處理時該樣品可以作為質控樣品。

表5. 不同PEG400濃度水準下觀察到的基質效應。此表展示了102.4 ng/ml濃度水準待測物標準添加樣品（頂行）和品質控制樣品的結果。數值為n=5。

基質	峰面積 變異係數%	平均 計算濃度	平均準確度
血漿，無PEG400	7.7	104.8	102.4%
血漿以體積比添加 0.01% PEG400	5.3	99.4	97.1%
血漿以體積比添加0.1% PEG400	3.2	76.7	74.9%

PEG400是藥物研究中常用的配方劑，對電噴霧電離具有顯著的抑制作用。穩定標記的同位素內標通常可以補償這種電離抑制，只要分析物的濃度水準高於最低定量限樣品，就可以準確定量分析。在藥代動力學的研究工作中，穩定的同位素內標並不是都能獲得，所以也經常選擇化學結構相似化合物。即使選擇化學結構性質相似的化合物作為內標，但是電離抑制往往會對分析物和內標物產生不同程度的抑制影響，特別是當它們在色譜上被完全分離的時候。在這種情況下，我們選擇了芬太尼的代謝物諾芬太尼作為內標，並且不用考慮色譜分離的情況。以102.4 ng/mL待測物水準為例，不同濃度PEG400對於未經處理血漿樣品的基質影響見表5。不同的標準添加濃度血漿樣品的基質效應在兩個PEG400濃度水準下的結果與102.4 ng/ml水準下結果非常相似。

結論

本研究的目的是評估在早期的常規的生物樣品定量分析中Echo MS系統的適用性。在本研究中考察了三種不同的血漿樣品製備方法來評估最簡單的樣品製備方法對於資料品質的影響。結果顯示，使用稀釋、基本的蛋白沉澱和不經前處理直接進樣這三種樣品製備方法之間對於最終的資料結果並沒有顯著性差異。

對於常規分析而言，Echo MS系統的分析靈敏度要求是足夠的，在這種情況下Echo MS系統分析的速度和操作的簡便性對於週期性比較長的生物分析實驗室來說是一個極具吸引力的選擇。

在接下來的研究工作中，我們將考察更複雜的樣品製備方法（例如固相萃取技術）對靈敏度的影響。此外，還將考察穩定的同位素內標的使用，從而進一步提高資料品質。

參考文獻

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臨床診斷產品線僅用於體外診斷。僅憑處方銷售。這些產品並非在所有國家地區都提供銷售。獲取有關具體可用資訊，請聯繫當地銷售代表或查閱<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他產品僅用於研究。不用於臨床診斷。

本文提及的商標和/或註冊商標，也包括相關的標識、標誌的所有權，歸屬於AB Sciex Pte. Ltd. 或在美國和/或某些其他國家地區的各權利所有人。Echo和Echo MS是屬於美國或在其他國家地區的Labcyte, Inc.的商標或註冊商標，該商標經許可使用。所示圖像僅用於說明目的，可能不是產品和/或技術的精確表示。樣品盤可以從貝克曼庫爾特生命科學事業部購買。- Beckman Coulter®商標經許可使用。

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-11649-ZH-A. AB SCIEX™ 商標經許可使用。



快速定量分析發酵液樣品以評價酵母工程菌的轉化效率

使用 **Echo™ MS** 系統的聲波激發進樣與質譜耦合技術

Rahul Baghla¹, Chang Liu², Rolf Kern¹

¹ SCIEX, USA, ² SCIEX, Canada

近年來，由於基因工程、微生物學、生物化學和分子生物學等學科的發展，合成生物學領域開始呈指數型增長。合成生物學的目的是使微生物產生所需的產物，因此必須通過選擇適當的環境條件和選擇高產量的菌株來優化所需產物的產出效率。在選擇一種用於大規模商業生產的菌株之前，可能需要開發和評估成千上萬種菌株。這需要對成千上萬個樣品中的目標產物進行定量分析；而且這個過程需要盡可能快地完成，這樣才能實現菌株的篩選優化。

SCIEX Echo MS系統是一個高通量、基於電噴霧電離質譜的系統，它使用聲波激發進樣技術（ADE）來精準控制從進樣板轉移到開放式探針介面（OPI）的樣品液滴量，這個開放式探針介面直接連接到SCIEX Triple Quad™ 6500+ 系統。這項分析技術具有電噴霧質譜的高靈敏度以及化合物研究的應用範圍，同時能夠以非接



觸、幾乎無殘留的分析方式每秒分析一個樣品。2.5 nL的小體積進樣明顯稀釋了複雜樣品基質中的基質抑制因數，從而簡化了樣品進樣分析前的製備過程。

在這裡，我們通過考察使用最簡單的樣品製備方法即直接分析酵母發酵液中目標化合物的能力，來評估Echo MS系統在合成生物學工作流程中快速篩選菌株的實用性。

Echo MS 系統進行菌株篩選的主要特徵

- 樣品分析速度可達到每秒1個樣品，滿足大量樣品篩選的高通量要求
- 精確定量可以實現產物濃度微小差異的區分（圖1）
- 只需要最簡單的樣品製備方法就可以實現分析方法的高通量和定量準確度要求
- Echo MS系統的靈敏度測試結果顯示所有濃度水平均可以獲得高品質的資料

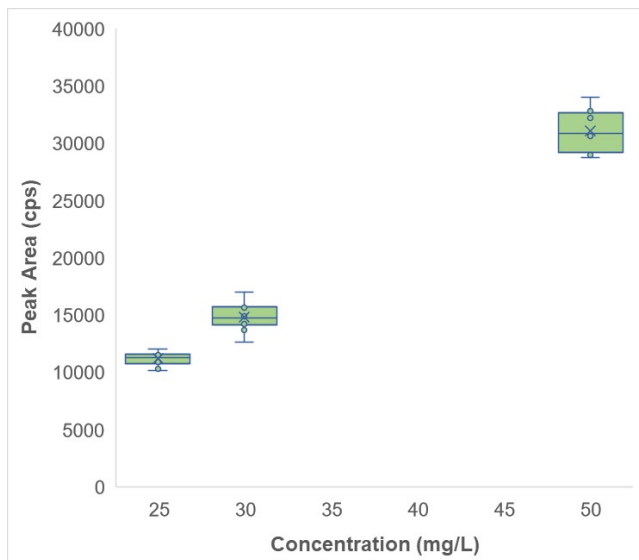


圖1. 定量結果重現性好。在菌株篩選過程中，能夠精確定量發酵液中目前分析物的濃度差異的能力至關重要。在這裡，1x稀釋發酵液樣品中每個濃度水準的血管緊張素重複採樣10次。25和30 mg/L樣品之間存在顯著性差異。

方法

樣品製備： 標準添加血管緊張素 (DRVYIHPFHL, MW=1295.6) 的酵母發酵液樣品，由合作者大量供應。用體積比為4:1的乙腈/水溶液溶解活性發酵液，在其中加入血管緊張素標準品，使發酵液中血管緊張素含量分別為25, 30和50 mg/L。然後將標準添加樣品以體積比為40%：60%的乙腈/水溶液稀釋1倍、10倍和100倍，將稀釋後的樣品以14000 rpm/min離心15分鐘，並轉移至96孔板中。樣品在-40°C下保存至分析。

Echo MS系統進行分析之前，每個樣品轉移50 µL到Echo 384孔板中（貝克曼生命科學384PP 2.0微孔板）。

聲波激發進樣法： 更好的聲波激發進樣方法的優化-樣品液滴在進樣板中產生以及傳遞到質譜的ESI離子源，會涉及到幾個參數。首先是選擇合適的載體溶劑，這就類似于高效液相色譜的流動相。在本實驗中選擇體積比為60:40:0.1（乙腈/水/甲酸）作為載體溶劑，最佳流速為450 µL/min。

質譜分析： Echo MS 系統包括SCIEX Triple Quad™ 6500+ 液質聯用系統，由SCIEX OS軟體進行控制。血管緊張素 (DRVYIHPFHL) 通過單一MRM通道 (649.1 → 784.4 m/z, CE=40, DWell=30 ms) 進行監測。OptiFlow™離子源的源參數為：GS1為90，GS2為70，溫度為600 °C。

資料處理： 峰面積使用SCIEX OS軟體進行積分。

表1.峰面積和重現性結果。每個濃度水準樣品以及每個稀釋樣品進行10次重複採集。結果顯示資料結果具有非常好的重現性。

25 mg/L	1x	1	11174	5.2
30 mg/L	1x	1	14787	7.9
50 mg/L	1x	1	31078	5.5
25 mg/L	10x	4	6106	4.2
30 mg/L	10x	4	7269	7.5
50 mg/L	10x	4	16202	5.2
25 mg/L	100x	10	1386	14.6
30 mg/L	100x	10	1664	5.7
50 mg/L	100x	10	2982	7.5

定量的準確度

樣品為三個不同濃度水準（25、30和50 mg/L）不同稀釋倍數（1倍，10倍 和 100倍）的血管緊張素發酵液。每個樣品重複採樣10次，以展示聲波激發與質譜耦合技術在該基質中的重現性（圖2）。所有稀釋液的檢測結果都表現出很好的重現性，即使是最小稀釋倍數樣品（1倍）也表現出較好的重現性，這表明在這類實驗中可以使用最簡單的樣品製備方法就可以達到預期的結果（表1）。此外，重現性足夠好，可以很容易地區分出相同濃度樣品之間的差異（圖1），這是在菌株選擇的過程中起著至關重要的決定作用。

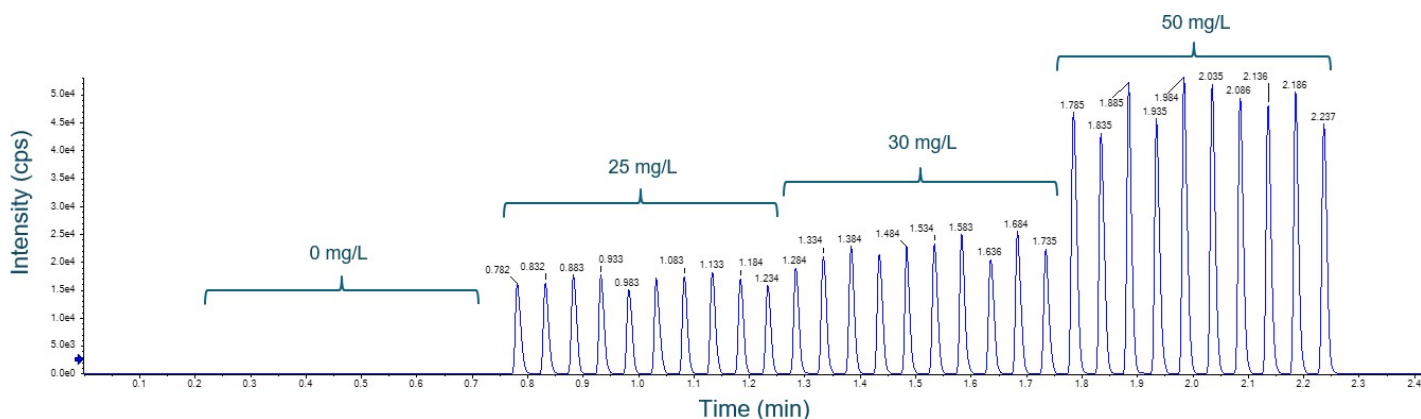


圖2.為未稀釋樣品中的血管緊張素肽的原始質譜資料。每個濃度水準採用單液滴聲波激發進樣法重複採集10次。3個濃度水準的樣品在最簡單的樣品製備方法下都具有很好的重現性（表1）。

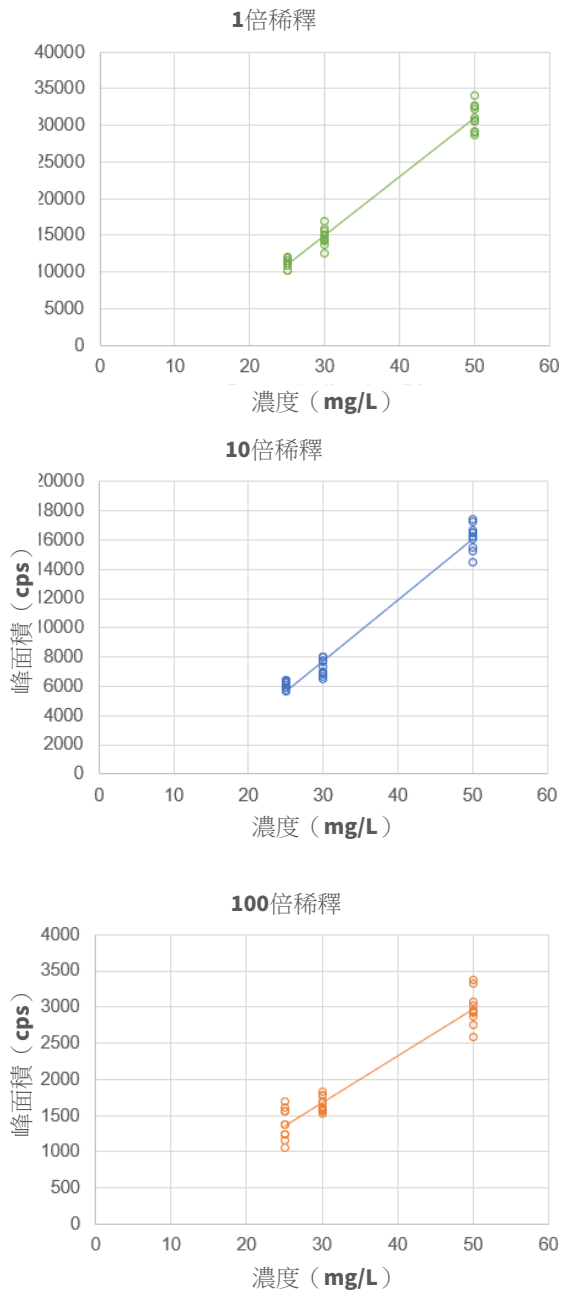


圖3. 三個稀釋系列濃度水準下發酵液樣品中血管緊張素濃度曲線。最簡單的樣品製備方法製備的樣品中觀察到樣品濃度具有良好的線性和重現性結果。

圖3所示為三個稀釋系列濃度水準樣品的線性和精密度結果。當樣品稀釋倍數變大時，可以增加樣品進樣的液滴數來提高目標物的信號回應。對10倍稀釋後的樣品，採用4個液滴進樣量以達到好的效果。對於100倍稀釋樣品，使用了10個液滴進樣量，也達到了較好的實驗結果，儘管該系列濃度梯度的最低濃度點顯示出比預期中更高的變異係數，但在三個稀釋系列的稀釋液樣品中依然可以觀察到良好的線性關係。

結論

研究結果表明，Echo MS系統能夠快速產生高品質的資料結果，通常對於一些發酵液基質來說，使用最簡單的樣品製備方法就可以進行基質中的目標肽分析。這個分析平臺可以快速生成定量資料以評估微生物菌株的產出效率，這將有助於更快速的菌株選擇，菌株篩選這一過程在合成生物學領域成本耗費較高，Echo MS系統解決了這一瓶頸問題

參考文獻

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臨床診斷產品線僅用於體外診斷。僅憑處方銷售。這些產品並非在所有國家地區都提供銷售。獲取有關具體可用資訊，請聯繫當地銷售代表或查閱<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他產品僅用於研究。不用於臨床診斷。

本文提及的商標和/或註冊商標，也包括相關的標識、標誌的所有權，歸屬於AB Sciex Pte. Ltd. 或在美國和/或某些其他國家地區的各權利所有人。Echo和Echo MS是屬於美國或在其他國家地區的Labcyte, Inc.的商標或註冊商標，該商標經許可使用。所示圖像僅用於說明目的，可能不是產品和/或技術的精確表示。樣品盤可以從貝克曼庫爾特生命科學事業部購買。Beckman Coulter®商標經許可使用。

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-11695-ZH-A. AB SCIEX™商標經許可使用。

SCIEX Echo™ MS系統對發酵液中多種成分進行快速高通量篩選

Rapid and High Throughput Screening of Multiple Components in Fermentation Broth by SCIEX Echo™ MS System

陳俊苗，司丹丹，龍志敏

Junmiao Chen, Dandan Si, Zhimin Long

SCIEX應用支援中心，中國

Key Words : SCIEX Echo™ MS System, Fermentation Broth, High Throughput Screening, Synthetic Biology

引言

合成生物學 (Synthetic Biology) 是生物學、工程學、化學和資訊技術相互交叉形成的一個新興領域。通過微生物發酵的方式生產大宗化學品和天然產物能夠部分替代石油化工煉製和植物提取也是合成生物學的一種重要應用。在微生物發酵過程中，生產目標化學品的合成途徑可能不存在於單一生物中，同時合成途徑創建後通常效率較低，因此需要對合成途徑進行即時監測和優化，以提高其效率^[1]。在即時監測、優化及後期工業化生產過程中需要對發酵液中多個目標產物進行含量檢測，由於樣品數量且需要複雜的樣品前處理，目前對於發酵液中成分快速和高通量的分析成為微生物發酵生產程序控制的一個瓶頸。

SCIEX Echo™ MS系統採用聲波激發耦合質譜系統 (Acoustic Ejection Mass Spectrometry, AEMS) 進行樣品採集，是一個高通量、基於電噴霧電離質譜的系統。SCIEX Echo™ MS系統使用聲波激發進樣技術 (ADE) 來精準控制從樣品板轉移樣品到開放式探針介面 (OPI)，該開放式探針介面直接連接到SCIEX Triple Quad™ 6500+系統。這種非接觸式進樣方式確保進樣過程無殘留的同時可做到每秒分析1個樣品，在多個離子通道同時檢測時甚至可達到每秒3個樣品的超快採集速度。

本方法採用SCIEX Echo™ MS系統對發酵液中多種成分進行了快速的分析，其中包含戊二胺、賴氨酸、琥珀酸及癸二酸等長鏈二元酸類化合物共10種。本方法前處理簡單、樣品用量小、分析時間短且通量高，適合微生物發酵生產中複雜樣品的快速高通量篩選。

SCIEX Echo MS系統檢測發酵液樣品優勢：

1. 以1秒每個樣品的速度分析樣品，真正實現高通量分析大量樣本。
2. 良好的線性及靈敏度滿足發酵液樣品中不同濃度水準化合物的準確定量 (表2)。
3. 樣品前處理簡單且只需少量樣品即可滿足準確定量的需求。
4. 非接觸式進樣方式在快速分析樣品的同時確保無殘留影響 (圖2)。

儀器設備：

SCIEX Echo™ MS系統



圖1. SCIEX Echo™ MS系統

樣品製備

所有化合物的標準品及發酵液樣品採用甲醇水 (V:V : 1:1) 稀釋配置，發酵液上清稀釋一萬倍後取50 μL加入384孔樣品板中，進樣體積 25 nL。

ADE方法：

聲波激發進樣方法需要一種合適的載體溶劑把樣品液滴帶入到 OPI 開放探針埠然後進入離子源，類似于高效液相方法中的流動相。本實驗選擇含 0.05% 甲酸的純甲醇作為載體溶劑，最佳流速為 360 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

質譜條件：

- 電離模式：正離子模式
- 掃描方式：MRM 多反應監測
- 氣簾氣 CUR: 20psi 源溫度 Tem : 300°C
- 霧化氣 Gas1 : 90psi 輔助氣 Gas2: 45psi
- MRM 參數：如表 1

表 1. 10 種發酵液成分的質譜參數

名稱	Name	Q1	Q3	DP	CE
琥珀酸	succinic acid	117.1	72.7	-50	-15.3
正癸酸	Decanoic acid	171.1	171.0	-50	-10.0
10-羥基癸酸	10-Hydroxydecanoic acid	187.2	169.1	-50	-22.1
癸二酸	Sebacic acid	201.1	139.1	-55	-21.5
12-羥基十二酸	12-Hydroxydodecanoic aci	215.2	197.0	-50	-23.7
十二烷二酸	Dodecanedioic acid	229.1	211.2	-50	-22.9
16-羥基棕櫚酸	16-Hydroxyhexadecanoic acid	271.3	225.1	-30	-29.0
戊二胺	1,5-Diaminopentane	103.1	86.0	50	13.2
1,10-癸二醇	Decylene glycol	175.1	83.0	70	12.6
賴氨酸	Lysine	147.1	84.1	70	22.0

實驗結果

線性及回收率：10 種化合物採用 3 個質譜方法進樣分析，所有 10 種化合物在線性範圍內線性良好，線性關係 R 值均大於 0.99，定量下限 (LLOQ) 連續 6 次進樣的 RSD 小於 12%。加標回收率實驗採用向樣品中加入 5 μM 標品來計算，所有化合物加標回收率大於 80%。線性範圍、重複性和回收率資訊見表 2。所有化合物均進行重現性考察及殘留考察，結果顯示 10 個化合物在標曲範圍內 6 次進

樣重現性良好，在 500 μM 高濃度連續進樣 6 次後，10 個化合物均沒有殘留。圖 2 舉例展示了戊二胺的原始峰圖，其中包含各標曲點、空白溶劑及基質樣品連續 6 次進樣的譜圖，從圖中可以看出在高濃度 500 μM 樣品連續進樣 6 次後，空白溶劑中沒有任何殘留。另外標曲不同濃度點峰面積成線性變化且重現性較好，線性範圍可達 2000 倍。

表 2. 10 種化合物線性範圍及回收率資訊

名稱	標曲範圍	R 值	LLOQ RSD%	加標回收率
琥珀酸	0.84 μM -84.7 μM	0.997	10.84%	111%
正癸酸	1.10 μM -29.1 μM	0.996	9.85%	82%
10-羥基癸酸	0.11 μM -5.4 μM	0.997	11.20%	94%
癸二酸	0.05 μM -9.9 μM	0.994	7.90%	86%
12-羥基十二酸	0.09 μM -4.6 μM	0.996	8.50%	104%
十二烷二酸	0.08 μM -8.7 μM	0.996	9.20%	104%
16-羥基棕櫚酸	0.18 μM -7.4 μM	0.993	8.90%	97%
戊二胺	0.10 μM -200.0 μM	0.999	6.90%	105%
1,10-癸二醇	0.11 μM -114.9 μM	0.996	9.20%	90%
賴氨酸	0.14 μM -136.9 μM	0.998	8.90%	84%

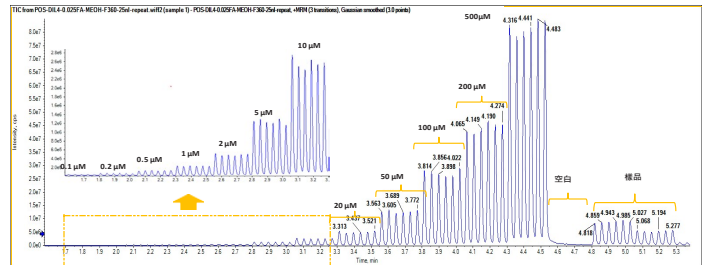


圖 2. 戊二胺標準品及樣品原始峰圖資訊

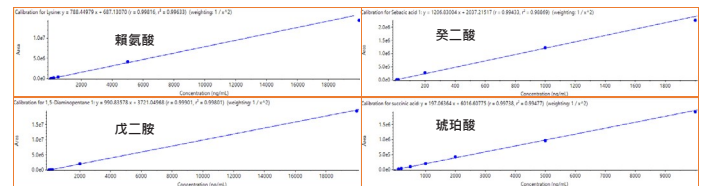


圖 3. 部分化合物標曲

總結

本文使用SCIEX Echo™ MS 系統建立了發酵液中10種目標化合物的快速高通量定量方法。各化合物線性關係良好，加標回收率大於80%且沒有任何殘留問題。結果表明Echo™ MS系統能夠快速產生高品質的資料結果，確保只在最簡單的樣品前處理方法下對發酵液基質中戊二胺、氨基酸及其他8種有機酸進行快速準確定量。該方法定量準確、通量高且樣品前處理簡單可用於微生物發酵工程前期菌株的快速篩選及發酵過程的即時監測和優化，提高生產效率。

參考文獻

1. Rapid quantitative analysis of fermentation broth samples to assess efficiency of engineered yeast strain turnover. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11695-A.

SCIEX臨床診斷產品線僅用於體外診斷。僅憑處方銷售。這些產品並非在所有國家地區都提供銷售。獲取有關具體可用資訊，請聯繫當地銷售代表或查閱<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他產品僅用於研究。不用於臨床診斷。

本文提及的商標和/或註冊商標，也包括相關的標識、標誌的所有權，歸屬於AB Sciex Pte. Ltd. 或在美國和/或某些其他國家地區的各權利所有人。Echo和Echo MS是屬於美國或在其他國家地區的Labcyte, Inc.的商標或註冊商標，該商標經許可使用。所示圖像僅用於說明目的，可能不是產品和/或技術的精確表示。樣品盤可以從貝克曼庫爾特生命科學事業部購買。- Beckman Coulter®商標經許可使用。

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13456-ZH-A. AB SCIEX™ 商標經許可使用。



Ultra-fast quantification of alprazolam in human plasma extracts

Sensitive and robust results using the Echo® MS System

Mackenzie Pearson, Rahul Baghla, Rolf Kern
SCIEX, USA

Benzodiazepines are often used to treat anxiety, insomnia and central nervous system disorders. They belong to the class of depressant drugs, acting on GABA receptors to dampen neural pathway excitation and consequently provide a calming effect.¹ They are among the most common prescribed psychiatric medications. However, benzodiazepines are often accompanied by other drugs of abuse and detected alongside opioids in many overdose cases and fatalities.²

Alprazolam is the most commonly prescribed benzodiazepine for anxiety and panic disorders.³ As such, rapid, high-throughput detection of alprazolam in plasma is critical to forensic and clinical toxicology. LC-MS analysis strategies can be time consuming to develop and implement as they typically require lengthy and costly solid-phase extraction (SPE) sample preparation. Acoustic Ejection Mass Spectrometry (AEMS) offers a clear alternative for analysis of alprazolam in plasma. Requiring minimal sample preparation and no chromatographic separation, it provides increased sample throughput without sacrificing robustness or reproducibility.



The Echo® MS System with a SCIEX Triple Quad™ 6500+ Mass Spectrometer provides sensitive, high-throughput quantification of alprazolam. The system combines Acoustic Droplet Ejection technology with an Open Port Interface (OPI) to deliver nanoliter sample volumes with minimal carryover. The small sampling size reduces matrix suppression and facilitates easy sample preparation.⁴

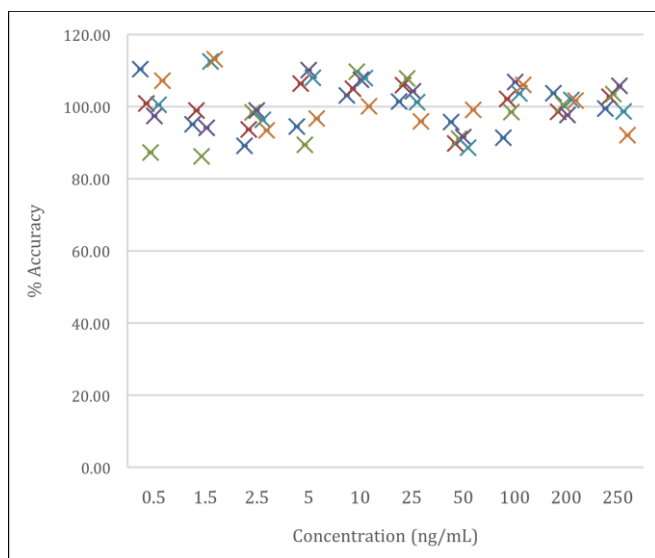


Figure 1. Highly reproducible quantification. 6 replicates at each concentration level of alprazolam in extracted human plasma showed excellent % accuracy with %CVs below 15% at all levels.

Key features of the Echo® MS System for high-throughput bioanalysis quantification

- Ultra-fast 2 sec/sample analyses provide high throughput for quantifying large numbers of samples
- Liquid-liquid extraction (LLE) sample preparation ensures excellent quantitative accuracy
- Exceptional sensitivity of the Echo® MS System yields high quality data at all concentration levels

Experimental details

Sample preparation: Alprazolam was spiked into human plasma in the range of 0.5 ng/mL to 250 ng/mL along with 50 ng/mL of internal standard (alprazolam D5). Samples were processed using a liquid-liquid extraction method as follows. 1 mL of di-isopropyl ether was added to 0.3 mL aliquots of spiked plasma. Samples were vortexed for 1 minute followed by centrifugation at 12,000 rpm for 5 minutes. 0.8 mL of supernatant liquid was collected and dried under a nitrogen stream. Samples were reconstituted in 100 µL of 25% v/v methanol in water and transferred to a 384-well plate for analysis by AEMS. Plates are available from Beckman Coulter Life Sciences.

Acoustic ejection method: Methanol was used as carrier solvent in this assay at 425 µL/min. 50 nL sample volumes were ejected into the mass spectrometer for analysis.

Mass Spectrometry: The Echo[®] MS System includes a SCIEX Triple Quad 6500+ System and was controlled by SCIEX OS Software 1.6.10. The optimized MS parameters are listed in Table 1.

Table 1. Optimized MS parameters.

Name	Q1 / Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Alprazolam	309.2 / 205.1	55	61	9
Alprazolam D5	314.2 / 210.0	55	55	9
Source parameters	Value	Source parameters	Value	
Curtain gas (psi)	25	CAD gas (psi)	9	
Ion source gas 1 (psi)	90	Ion spray voltage (V)	5000	
Ion source gas 2 (psi)	70	Source temperature (°C)	350	

Data processing: Data processing was performed using SCIEX OS Software. A calibration curve was generated with six replicates at each concentration level to evaluate ejection reproducibility and accurately determine the lower limit of quantification (LLOQ). The calibration curve is shown in Figure 2 and a quantification summary is listed in Table 2.

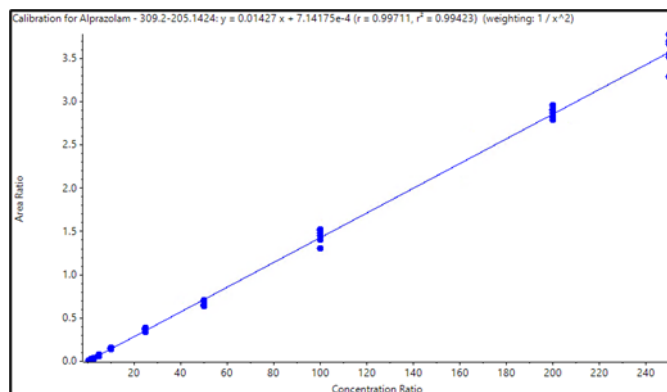


Figure 2. Calibration curve for quantification of alprazolam in human plasma using the Echo[®] MS System. Good linearity and reproducibility were observed for the samples ejected in six replicates at each concentration level.

Results

Samples analyzed in six replicates demonstrated the solid reproducibility of AEMS when combined with liquid-liquid extraction. Excellent %CVs were achieved across all concentration levels with no interference in blank human plasma samples (Figure 3). Even at the extremely short analysis time of 2 seconds per sample, the method yielded an LLOQ of 0.5 ng/mL for alprazolam in human plasma. As summarized in Table 2, the assay accuracies of 92.67–105.55% and %CVs were well within standard acceptance criteria for all tested samples. The calibration curve covered 3 orders of magnitude (0.5–250 ng/mL) and displayed linearity with a regression coefficient (r) of 0.9971 using weighting of 1/x² (Figure 2).

Table 2. Quantification summary for alprazolam analysis by the Echo[®] MS System.

Actual Concentration (ng/mL)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	CV (%)	N
0.50	0.50	100.63	8.04	6
1.50	1.50	100.02	10.78	6
2.50	2.38	95.02	3.87	6
5.00	5.04	100.87	8.36	6
10.00	10.56	105.55	3.33	6
25.00	25.70	102.78	4.10	6
50.00	46.33	92.67	4.31	6
100.00	101.41	101.41	5.67	6
200.00	201.35	100.67	2.24	6
250.00	250.94	100.38	4.83	6

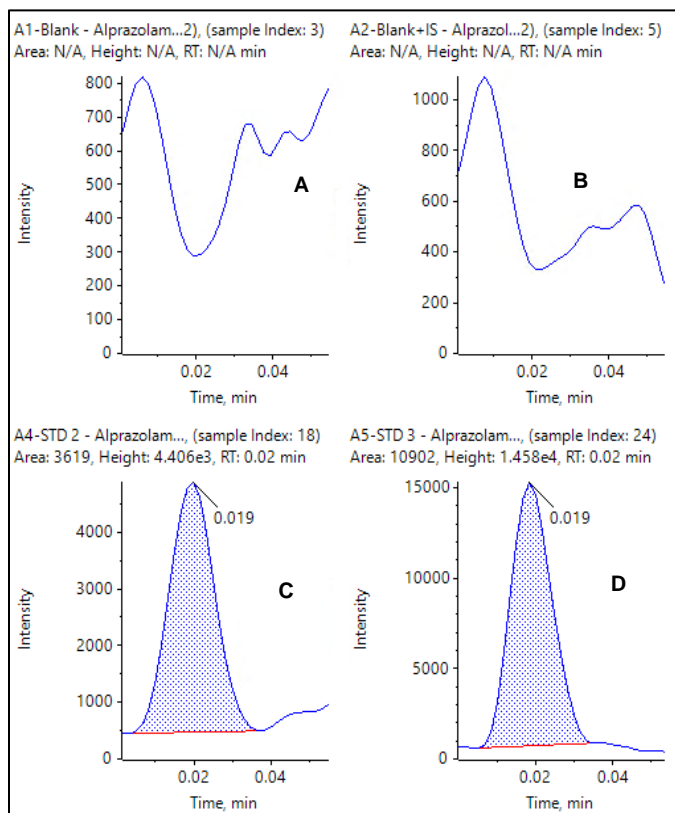


Figure 3. XICs for transition for alprazolam. Double blank and blank from extracted plasma (A and B), LLOQ at 0.5 ng/mL (C) and 1.5 ng/mL (D).

Conclusions

- The Echo[®] MS System produced very sensitive, accurate and reproducible results for the quantitative analysis of alprazolam in human plasma.
- The extremely short analysis times (2 sec/sample) enabled rapid generation of quantitative data for high numbers of samples.

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Echo and Echo MS are trademarks or registered trademarks of Labcyte, Inc. in the United States and other countries, and are being used under license. Other trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries.

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13059-A. AB SCIEX[™] is being used under license.

References

1. Votaw VR, Geyer R, Rieselbach MM, McHugh RK. (2019) The epidemiology of benzodiazepine misuse: A systematic review. *Drug Alcohol Depend.* **200**: 95-114.
2. Moore TJ, Mattison DR, (2017) Adult Utilization of psychiatric drugs and differences by sex, age, and race. *JAMA Intern. Med.* **177**, 274–275.
3. Grohol J. (2016) *Top 25 Psychiatric Medication Prescriptions for 2013*.
4. 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](#).

聲波激發耦合質譜儀（AEMS）超快速檢測污水中17種毒品的含量

使用Echo™ MS 系統，以每秒鐘一個樣品的分析速度突破定量質譜分析通量的瓶頸

AEMS ultra-fast detection of the concentration of 17 drugs in sewage

Using the SCIEX Echo™ MS system to break bottlenecks in quantitative mass spectrometry throughput at the rate of one sample per second

李志遠¹，陳俊苗¹，孫小傑¹，劉冰潔¹，郭立海¹

Li Zhiyuan¹, Chen Junmiao¹, Sun Xiaojie¹, Liu Bingjie¹, Guo Lihai¹

¹ SCIEX China

Key Words : Echo™ MS, AEMS, ultra-fast, quantitative, sewage, drug

儀器簡介

Echo™ MS系統（見圖1），即聲波激發耦合質譜儀（Acoustic Ejection Mass Spectrometry, AEMS）是一款由聲波液滴噴射技術（Acoustic droplet ejection technology, ADE），開放埠探針採樣介面（Open-port probe sampling interface, OPI）以及強大定量能力的SCIEX Triple Quad™ 6500+ 系統（配備電噴霧離子源，ESI電離模式）三位一體耦合在一起的開創性新產品。

Echo™ MS系統集成了ADE技術和OPI技術；ADE的作用是通過優化設計，用聲波能量將樣品從樣品板中極小的樣品量（2.5 nL）激發出來，激發出來的小液滴傳輸到一個固定倒置的OPI中，樣品小液滴在OPI中與傳輸流體相遇並稀釋，通過OPI將樣品輸送到常壓下ESI電離模式的質譜中進行分析檢測。基本工作原理如圖2：

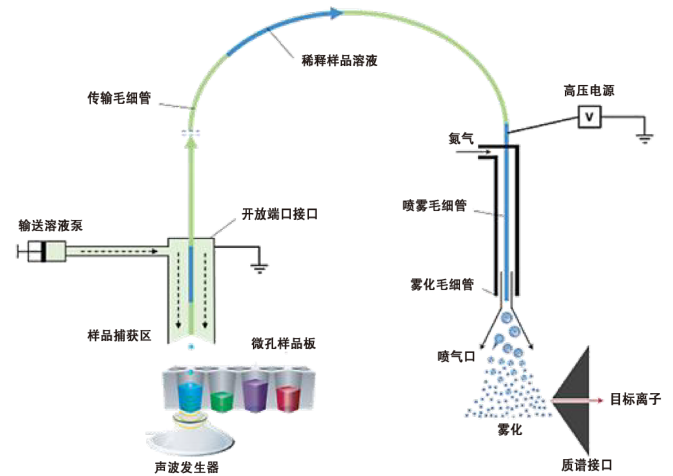


圖2. Echo™ MS系統基本工作原理示意圖



圖1. Echo™ MS 系統

污水毒品檢測技術是通過提取生活污水中存在的毒品及其代謝物的含量，通過高靈敏的液質聯用檢測技術，對特定區域的生活污水進行抽樣檢測，結合污水水質參數和污水排放人口數量，推算出該區域吸毒人群規模、毒品消耗量等。在禁毒工作中，生活污水毒品檢測技術對開展制毒窩點緝查、毒品犯罪打擊和新精神活性物質預警等工作有著重大的參考價值和指導意義，污水驗毒堪稱禁毒的又一大“黑科技”。污水驗毒與傳統毒情調查方法完全不同，該方法具有更加客觀、準確、快速等優點。

污水驗毒行業難點

1. 傳統的液質聯用通常會採用梯度洗脫，通常一個樣品的分析時間可能超過10 min，耗時較長。污水驗毒實際檢測的樣品量很大，對於成百上千份實際樣品的檢測，連續進樣也需要數周到數月的資料獲取時間，該方法的實用性目前存在較大問題。
2. 傳統的液質聯用方法需要消耗預柱、色譜柱（幾千針後需要更換）等常規液相色譜耗材，此外，對流動相配置重現性要求較高。
3. 通常毒品及其代謝物進入到生活污水後被稀釋上千甚至上萬倍，其在污水中的含量通常只有納克甚至皮克級別。行業內通常採用固相萃取法進行樣品前處理，該方法耗費時間較長，通常一個樣品的前處理時間一般會超過2小時，且固相萃取柱耗材成本較高。

高通量定量的Echo™ MS系統污水驗毒特點

1. Echo™ MS 系統通過優化流速，以每秒鐘1個樣品的檢測速度進行快速取樣分析檢測，每個樣品的分析速度比傳統液質聯用方法的分析速度（每個樣品10 min）快幾百倍以上，對於成百上千份實際樣品的檢測，僅需要幾小時即可完成，Echo™ MS 系統具有遠超傳統液質聯用檢測的分析速度。
2. Echo™ MS 系統配備標準的384孔或1536孔進樣板，適合快速大批量樣品檢測。
3. Echo™ MS 系統無需使用色譜柱、預柱等常規液相色譜耗材。
4. 該方法採用磁珠吸附法對污水樣品進行前處理，耗時相對較短，且操作簡單。

實驗方法

Echo™ MS 條件：

- 耦合流體：純水
- 流動相：甲醇+0.1%甲酸
- 流速：360 µL/min
- 進樣模式：SP模式（即樣品粘度小於水）
- 進樣體積：2.5 nL

質譜條件：

- 離子源參數：
- Curtain gas (psi)：20
- CAD gas：9
- Ionspray voltage (V)：5500
- Temperature(°C)：300
- Ion source gas1 (psi)：90
- Ion source gas2 (psi)：45

表1. MRM離子對資訊表（共17種毒品，包含17種氘代內標）

編號	毒品名稱	Q1	Q3	DP	CE
1	苯丙胺	136.1	119.1	20	13
		136.1	91.1	20	23
	苯丙胺-D5	141.1	124.1	20	13
2	甲基苯丙胺	150.1	119.1	25	16
		150.1	91.1	25	27
	甲基苯丙胺-D5	155.2	121.1	25	16
3	O6-單乙醯嗎啡	328.2	211.1	120	34
		328.2	165.1	120	50
	O6-單乙醯嗎啡-D3	331.2	211.1	120	34
4	嗎啡	286.1	201.1	110	36
		286.1	165.1	110	57
	嗎啡-D3	289.2	201.1	110	36
5	氯胺酮	238.1	207.1	35	19
		238.1	125	35	35
	氯胺酮-D4	242.1	211.1	35	19
6	去甲氯胺酮	224.1	207.1	30	18
		224.1	125	30	35
	去甲氯胺酮-D4	228.1	211.1	30	18
7	可卡因	304.2	182.1	80	27
		304.2	150.1	80	32
	可卡因-D3	307.2	185.1	80	27
8	苯甲醯愛康寧	290.1	168.1	70	26
		290.1	105	70	36
	苯甲醯愛康寧-D3	293.1	171.1	70	26
9	3,4-亞甲二氧基苯丙胺	180.1	133.1	15	25
		180.1	105.1	15	30
	3,4-亞甲二氧基苯丙胺-D4	184	167	15	16
10	3,4-亞甲二氧基甲基苯丙胺	194.1	163.1	30	16
		194.1	105.1	30	32
	3,4-亞甲二氧基甲基苯丙胺-D4	198.1	167.1	30	16
11	凱西酮	150.4	117.2	30	31
		150.4	132.2	30	17
	凱西酮-D5	155.3	122	40	31
12	甲凱西酮	164.1	105.1	70	31
		164.1	131.1	70	26
	甲凱西酮-D5	169.1	136.1	70	31
13	柯羅酸芬太尼	337.2	188.3	90	31
		337.2	105.2	90	45
	芬太尼-D5	342.2	105	90	45
14	地西洋	285.1	193	125	44
		285.1	154	125	35
	地西洋-D5	290	198	125	44
15	艾司唑侖	295.2	267.3	130	32
		295.1	205.2	130	54
	艾司唑侖-D5	300	272	130	34
16	美沙酮	310.2	265.2	40	21
		310.2	105.1	40	34
	美沙酮鹽酸鹽-D10	320	275	40	21
17	5F-MDMB-PICA	377	232	110	20
		377	144	110	54
	5F-MDMB-PICA-D4	381	236	110	20

污水樣品前處理過程

取50 mL污水樣品，磁性顆粒分散吸附20-30 min，磁性顆粒和污水分離後，加入3 mL有機溶劑洗脫磁性顆粒15 min後，移除磁珠，氮氣吹幹後，200 μ L甲醇水（甲醇:水 = 2:8, v/v）溶液復溶，濾膜過濾後，進樣分析。

實驗結果

標準曲線及定量下限考察

表2. 17種毒品標準曲線的線性範圍及定量下限表（以污水中含量計）

編號	毒品名稱	線性範圍 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
2	甲基苯丙胺	0.004-1	0.004
3	O6-單乙醯嗎啡	0.008-2	0.008
4	嗎啡	0.008-2	0.008
5	氯胺酮	0.004-2	0.004
6	去甲氯胺酮	0.008-2	0.008
7	可卡因	0.004-2	0.004
8	苯甲醯愛康寧	0.004-2	0.004
9	MDA	0.008-2	0.008
10	MDMA	0.008-2	0.008
11	凱西酮	0.004-2	0.004
12	甲凱西酮	0.004-2	0.004
13	枸橼酸芬太尼	0.004-2	0.004
14	地西洋	0.004-2	0.004
15	艾司唑侖	0.004-2	0.004
16	美沙酮	0.004-2	0.004
17	5F-MDMB-PICA	0.004-2	0.004

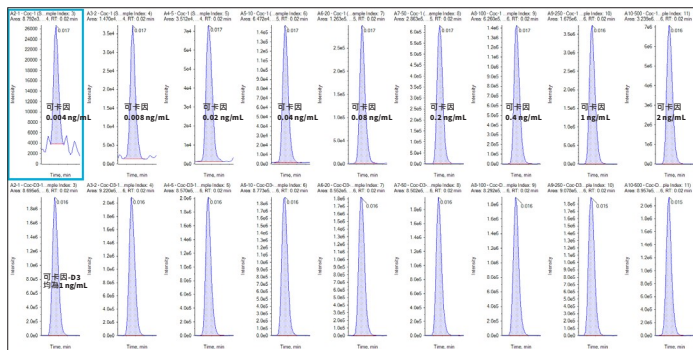


圖3. 標準曲線色譜圖舉例（可卡因及可卡因-D3）

基質樣品重現性考察

實驗考察了污水空白樣品添加17種毒品（相當於污水中添加濃度1 ng/mL）後經過前處理樣品，3平行樣本考察（即，sample-5、sample-6、sample-7），每個樣品分別連續進樣6針，資料表明：17種毒品峰面積的RSD值均小於5%，詳細資料清單如下表3。

表3. 17種毒品重現性考察資料統計表

編號	化合物名稱	化合物峰面積重複性RSD%（6針進樣）		
		sample-5	sample-6	sample-7
1	苯丙胺	3.4	2.3	2.5
2	甲基苯丙胺	3.4	3.8	4.5
3	O6-單乙醯嗎啡	2.7	3.4	3.4
4	嗎啡	1.6	4.9	4.7
5	氯胺酮	2.6	2.7	3.7
6	去甲氯胺酮	4.0	0.8	4.8
7	可卡因	4.8	4.8	3.6
8	苯甲醯愛康寧	1.4	2.5	2.7
9	MDA	2.3	3.4	4.1
10	MDMA	4.4	3.4	3.6
11	凱西酮	1.9	4.3	3.7
12	甲凱西酮	2.5	4.1	2.9
13	枸橼酸芬太尼	4.2	4.6	4.9
14	地西洋	3.3	4.4	4.5
15	艾司唑侖	2.1	3.3	1.9
16	美沙酮	5.0	4.9	2.3
17	5F-MDMB-PICA	1.1	3.7	2.0

基質效應和提取回收率考察

實驗考察了污水空白樣品經過前處理後添加17種毒品（相當於污水中添加濃度1 ng/mL），雙平行樣本考察（即，sample-3、sample-4），每個樣品在標準曲線下計算其濃度後除以250（理論添加濃度），計算可得該方法的基質效應（以 % 計），資料表明，該方法基質效應均大於70%，即基質干擾小於30%，詳細資料清單如下表4。

此外，實驗考察了污水空白樣品添加17種毒品（相當於污水中添加濃度1 ng/mL）後經過前處理樣品，3平行樣本考察（即，sample-5、sample-6、sample-7），每個樣品在標準曲線下計算其濃度後除以250（理論添加濃度），計算可得該方法的提取回收率（以 % 計），資料表明，該方法提取回收率均在80%以上（除去甲氯胺酮和凱西酮外），詳細資料清單如下表4。

表4. 17種毒品基質效應和提取回收率考察資料統計表

編號	化合物名稱	基質效應 %			回收率 %	
		sample3	sample4	sample-5	sample-6	sample-7
1	苯丙胺	81	95	88	100	96
2	甲基苯丙胺	90	100	93	91	91
3	O6-單乙醯嗎啡	97	102	105	95	97
4	嗎啡	96	91	92	101	97
5	氯胺酮	89	92	101	93	96
6	去甲氯胺酮	67	70	68	70	67
7	可卡因	93	98	94	93	92
8	苯甲醯愛康寧	84	98	94	92	99
9	MDA	89	94	97	96	97
10	MDMA	93	89	82	95	88
11	凱西酮	71	30	46	43	44
12	甲凱西酮	111	102	95	98	93
13	枸橼酸芬太尼	86	82	93	88	90
14	地西洋	97	104	97	94	95
15	艾司唑侖	87	90	95	88	89
16	美沙酮	92	82	96	87	92
17	5F-MDMB-PICA	86	80	99	93	96

總結

1. 本文通過Echo™ MS 系統（即聲波激發耦合質譜儀，AEMS）開發了高通量分析污水中的17種毒品檢測方法，該方法前處理採用磁珠吸附法，前處理操作簡單，耗時更短，適合大批量樣品的檢測。
2. Echo™ MS 系統配備的ADE技術，用聲波能量將樣品從樣品板中極小的樣品量（2.5 nL）激發出來，樣品小液滴通過OPI技術將樣品輸送到質譜系統中進行分析檢測，配備OptiFlow™ Turbo V離子源穩定高效的電噴霧電離技術的SCIEX Triple Quad™ 6500+ 質譜系統可以實現了廣泛的化合物覆蓋度，整個方案無需使用色譜柱、預柱等常規液相色譜耗材。
3. Echo™ MS 系統擁有超快的進樣速度，以每秒鐘1個樣品的檢測速度進行快速取樣分析檢測，配備標準384孔或1536孔進樣板，適合快速大批量樣品檢測。目前該實驗共檢測了127個樣品，以1個毒品的檢測為例，127個樣品可以在6.3 min完成全部檢測，與傳統污水驗毒液質聯用檢測方法相比（11 min每個樣品），127個樣品共需要耗時至少1397 min（約23.3 h），Echo™ MS 系統的樣品分析速度比傳統的液質聯用方法至少提升200倍以上。
4. 配備SCIEX Triple Quad™ 6500+質譜系統的Echo™ MS 系統同樣擁有強大的定量能力，資料顯示17種毒品的定量限可以達到0.004-0.008 ng/mL（以污水中含量計）；其重現性考察實驗中Echo™ MS 系統可以做到基質樣品RSD < 5%；此外，該方法的基質效應考察資料顯示17種毒品均可以做到70 %以上，即基質干擾小於30 %，表明該方法抗基質干擾能力強；提取回收率考察實驗中17種毒品均可達到80 %以上（除去甲氯胺酮和凱西酮外）。各項方法學資料顯示，通過Echo™ MS 系統開發的污水中的毒品檢測的方法適用性良好。

SCIEX臨床診斷產品線僅用於體外診斷。僅憑處方銷售。這些產品並非在所有國家地區都提供銷售。獲取有關具體可用資訊，請聯繫當地銷售代表或查閱<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他產品僅用於研究。不用於臨床診斷。

本文提及的商標和/或註冊商標，也包括相關的標識、標誌的所有權，歸屬於AB Sciex Pte. Ltd. 或在美國和/或某些其他國家地區的各權利所有人。Echo和Echo MS是屬於美國或在其他國家地區的Labcyte, Inc.的商標或註冊商標，該商標經許可使用。所示圖像僅用於說明目的，可能不是產品和/或技術的精確表示。樣品盤可以從貝克曼庫爾特生命科學事業部購買。- Beckman Coulter®商標經許可使用。

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13652-ZH-A. AB SCIEX™ 商標經許可使用。





The Power of Precision

