APPLICATION NOTE

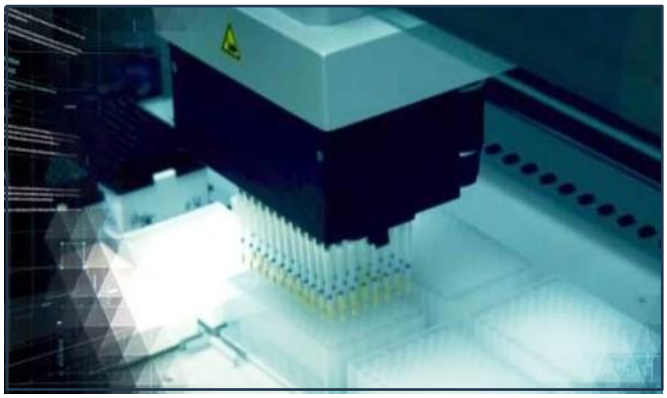
DPX 枪头式分散固相微萃取柱（DPX tips™）在尿液药物及代谢产物自动化分析中的应用

简介

临床及毒理实验室常用液/固相萃取法（SPE）对尿液中药物及代谢产物进行分析。SPE 处理得到的纯净样品结果一致性好、数据质量高，并且可延长质谱等仪器的使用寿命。然而 SPE 方法耗时长、成本高，因此越来越多的科研人员专注于开发使用“dilute and shoot (D/S)”方法获得高纯度样品。虽然 D/S 方法比较经济，且超灵敏，但其会降低 LC 柱子寿命，需要频繁的 LC-MS/MS 维护，样品需要反复上样，且数据分析时间较长。

枪头式分散固相微萃取柱（Dispersive Pipette Extraction，DPX）的出现弥补了传统 SPE 方法的缺陷。萃取枪头中填加了分散的填料，通过简单的吸打过程即可完成与样品的混合。DPX tips 能完美地与自动移液系统联合使用，使得样品纯化过程变得简单，其可在 10分钟内同时完成 96 个样品的纯化。

TECAN.



DPX tip 与 Tecan Freedom EVO 自动移液系统联合使用

1 平衡	吸打 30% 甲醇
2 结合	吸打水解的尿液
3 洗涤	吸打水
4 洗脱	吸打酸化的甲醇
5 稀释	加水
6 上样	纯净、浓缩的样品

工作流程

1. 将样品板（水解尿液）、3 个储液槽（分别装有水、 30% 甲醇、 1% 甲酸的甲醇）放入 TECAN EVO 仪器相应板位上。

2. TECAN 系统进行 Buffer 分配：一块多孔板每孔分装 200 µL水（洗涤液）、另一块多孔板每孔分装 150 µL 含有 1% 甲酸的甲醇 （洗脱液）。

3. TECAN 系统提起 DPX-RP/WAX 枪头，在 30% 甲醇储液槽中进行平衡。

4. DPX tips 反复吸打样品三次进行样品结合。

5. 水中吸打洗去多余的盐、尿素和肌氨酸酐。

6. 用少量洗脱液对目标分析物进行洗脱浓缩，无需蒸发。

7.对于 LC 系统，需要将洗脱液进行稀释，直到达到适当百分比的甲醇：本应用中 TECAN 系统在洗脱样品中加入 1050 µL 水（总体积为 1200 µL，12.5% 甲醇）。

8. 检测分析仪器： Thermo TSQ Vantage triple quadrupole instrument， Agilent 1260 HPLC + Agilent Poroshell EC-C18 column (3.0 x 50 mm, 2.7 µm)。

9. 10 µL 上样。

APPLICATION NOTE

结果与讨论

在 12.5-400 ng/mL 的浓度范围内，相关系数（R^2）均大于 0.99，大多数分析物在 6.25-800 ng/mL 的浓度范围内呈线性关系。相对标准偏差（%RSD）在 1.7-9.7% 之间（4 孔重复，400 ng/mL）。检测限（LODs）为 3.3 σ/m，σ 为最小非零校准点的标准差，m 为校准曲线斜率。LODs 范围在 0.25-12 ng/mL。定量限（LOQs）为10 σ/m，范围在 1.0-60 ng/mL（表 1）。

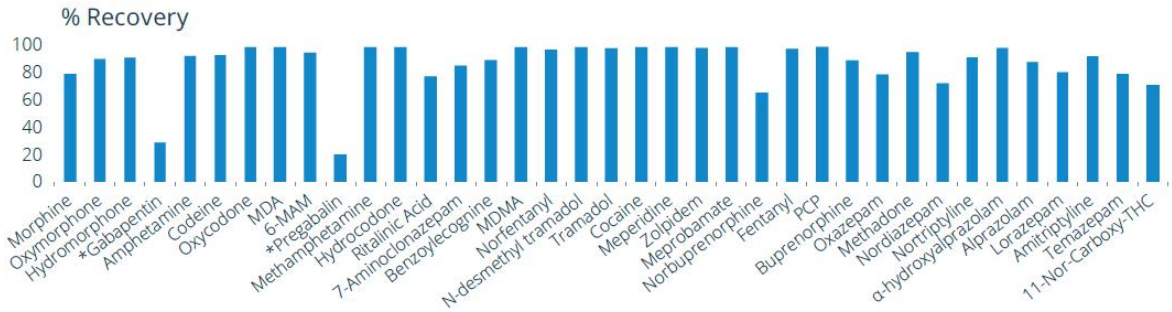
不同的分析方法及 LC-MS/MS 的敏感性决定着 LODs 和 LOQs 的结果。为了最大限度地提高敏感性，可以增加尿液样品体积和/或将样品洗脱体积增至 500 µL，然后对洗脱液进行蒸发。

结论

时间就是金钱，增加通量、节省时间就是节约成本。与传统 SPE 方法相比，DPX tips 联合高通量自动化系统在节省成本及时间的同时，减少了溶液使用量及废液量。更纯净的样品可减少由于基质干扰和/或低灵敏度而需要进行重复上样的可能性，也无需购买更昂贵的 LC-MS/MS 系统进行 "dilute and shoot" 方法，且可提高 LC-MS/MS 的使用效率。DPX 技术与 Tecan Freedom EVO 自动移液系统联合使用，可进行全面、快速简便的样品制备，是高通量临床和法医实验室理想的定制化解决方案。

表1.验证数据

化合物	R^2	%相对标准偏差（n=4）	最低检测限（ng/mL）	最低定量限（ng/mL）
吗啡	0.9974	5.0	4.5	13
氧吗啡酮	0.9956	9.2	4.9	15
氢吗啡酮	0.9974	6.6	7.4	22
加巴喷丁*	0.9948	4.8	20	60
安非他明	0.9965	7.2	12	36
可待因	0.9916	9.7	3.8	11
氧可酮	0.9967	4.4	2.7	8.2
MDA	0.9968	6.0	2.5	7.4
6-MAM	0.9937	7.6	0.7	2.2
普加巴林*	0.9907	6.2	13	39
甲基苯丙胺	0.9973	2.5	1.1	3.3
氢可酮	0.9935	8.2	3.0	9.0
利他林酸	0.9960	3.1	5.0	15
7-氨基氯硝西泮	0.9982	7.7	5.0	15
苯甲酰芽子碱	0.9945	6.5	5.0	15
MDMA	0.9969	3.1	2.0	6.3
去甲芬太尼	0.9931	6.5	1.0	4
N-去甲基	0.9925	6.6	8.0	25
曲马多	0.9959	8.9	4.0	12
可卡因	0.9990	5.6	6.7	20
盐酸麦佩里定	0.9917	5.2	5.5	16
唑吡旦	0.9932	6.5	8.8	27
环苯扎林	0.9915	8.7	1.1	3.5
去甲基	0.9918	8.7	2.8	8.5
芬太尼	0.9952	8.0	0.2	1.0
PCP	0.9980	2.9	4.8	14
丁丙诺啡	0.9917	8.5	1.5	4.5
去甲羟基安定	0.9957	4.8	2.3	7.0
美沙酮	0.9955	8.5	3.2	9.7
去甲安定	0.9957	9.0	5.6	17
去甲替林	0.9943	5.4	1.7	5.1
α-羟基阿普唑仑	0.9925	4.4	1.8	5.5
阿普唑仑	0.9952	5.7	12	38
劳拉西泮	0.9950	3.5	5.0	15
阿密曲替林	0.9958	5.1	3.4	10
羟基安定	0.9974	7.0	3.0	9.0
11-去甲基-羧基-THC	0.9846	1.7	2.8	8.5



DPX-RP/WAX tip 纯化后待测物的回收率。化合物包括：鸦片及鸦片类似物，苯并二氮杂卓类，普遍滥用药，非鸦片类止痛药，抗痉挛药，镇静催眠药，兴奋剂，抗抑郁药及图中标注的代谢物。