利用DPX枪头式分散固相微萃取柱（DPX tips™）及HAMLTON® 自动移液系统纯化尿液中的药物及其代谢物

在临床和法医实验室，一直使用固相萃取法 (SPE) 纯化尿液中的药物及其代谢物。SPE 方法提取的化合物干净，检测结果一致好，且对仪器伤害小。然而，SPE 耗时，成本高，实验室需要一种新的方法替代它。由于 LC-MS/MS 仪器昂贵，需要使用“dilute and shoot”(D/S) 法解决样品“脏”的问题。虽然 D/S 方法样品处理成本低，但需要高灵敏度的仪器，并且会缩短 LC 柱寿命，并且需要频繁的 LC-MS/MS 维护，重复的样品注射以及大量的数据分析时间。

分散固相萃取技术 (DPX) 解决了传统固相萃取方法的缺点。松散的树脂分散在 tips 内，通过简单的吸打操作，树脂与溶液混合。DPX tips 与自动移液系统相结合，摆脱了繁琐和耗时的的样品前处理过程。在不到 10 分钟内，可同时处理 96 个样品，与 D/S 方法相比，处理效率更高。



Hamilton NIMBUS96 with DPX-RP/WAX Tips

实验流程

1. 将装有酶解后尿样的孔板，装有水、30%甲醇和 1% 甲酸甲醇溶液的储液槽加载到NIMBUS系统中。
2. 用 NIMBUS 系统将一个孔板装 200 µL 水，另一个孔板装 150 µL 1% 甲酸甲醇溶液。
3. 安装 DPX-RP/WAX 到NIMBUS 系统。
4. 平衡柱子：DPX Tips 在 30% 甲醇中反复吸打 3 次。
5. 上样：DPX Tips 在酶解后尿样样品中吸打 3 次。
6. 洗涤：DPX Tips 在水中反复吸打吸打，以除去游离盐、尿素和肌酐。
7. 洗脱：DPX Tips 在 150 µL 1% 甲酸甲醇中反复吸打，得到的洗脱液无需蒸发溶剂。
8. 根据 LC 条件，将洗脱液稀释，达到合适的甲醇百分比，上样检测。本实验中，用 Nimbus 系统添加 1050 µL 水，总体积为1200 µL(12.5% 甲醇)。
9. 分析仪器：Thermo TSQ Vantage 三重四极杆仪器，

1 平衡	30% 甲醇
2 上样	酶解后的尿样
3 洗涤	水
4 洗脱	1% 甲酸甲醇
5 复溶	水
6 进样	进样检测

Agilent 1260 HPLC + Agilent Poroshell EC-C18 柱(3.0 x 50 mm, 2.7µm)，

10. 进样量：10 µL。

结果与讨论

检测结果是线性的，准确可靠的。在 12.5-400 ng/mL浓度范围，相关系数(R2)大于 0.99，大部分化

合物在 6.25–800 ng/mL 浓度范围内呈线性。以 400 ng/ml 为提取浓度，7 孔重复提取计算，相对标准偏差(%RSD）在 1.6-8% 之间。以 3.3(σ/m) 计算值为检测线，其中 σ 为的标准差最低非零校准器，m 为校正曲线的斜率。10(σ/m) 计算值为定量限。检测限（LODs）为 0.50 - 18 ng/mL，定量限（LOQs）为 1.5-54 ng/mL(表1)。

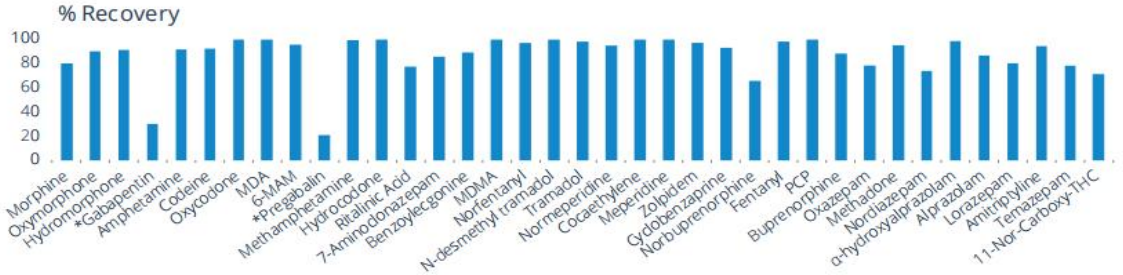
检测限（LODs）和定量限（LOQs）的结果是由实验分析方法和 LC-MS/MS 灵敏度决定。为了提高灵敏度，可以增加尿液样本体积或洗脱液体积增加到 500 µL，后续再进行溶剂蒸发。

结论

“时间就是金钱”，DPX Tips结合 HAMLTON® 自动移液系统缩短了纯化时间，提高了样品处理量，这对降低成本是非常重要的。与传统固相萃取方法相比，DPX Tips 需要的溶剂少，产生的废液也少，这直接降低了成本。更干净的提取物可以最大限度地减少由于基质干扰或低灵敏度而重复分析的可能性，以及购买更昂贵的 LC-MS/MS 仪器的需要，这在“dilute and shoot”(D/S) 方法中经常看到。当 DPX Tips 与 Hamilton NIMBUS96 自动移液处理系统相结合时，提供了一种全面、快速和易于操作的样品前处理方法，这种高通量方法是临床和法医实验室的理想选择。

表1. 化合物相关系数、相对标准偏差、检测限和定量限

Compound	R^2	% RSD (n=7)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
morphine	0.9969	4.0	5.0	15
Oxymorphone	0.9982	3.8	1.8	5.4
hydromorphone	0.9982	4.1	2.4	7.2
gabapentin*	0.9989	2.8	0.50	1.5
Amphetamine	0.9944	5.9	3.1	9.4
Codeine	0.9972	4.1	2.2	6.7
Oxycodone	0.9968	4.9	1.2	3.7
mdA	0.9940	7.3	5.0	15
6-mAm	0.9932	8.0	0.73	2.2
Pregabalin*	0.9972	4.7	2.5	7.6
methamphetamine	0.9993	2.5	1.1	3.3
hydrocodone	0.9949	5.8	0.93	2.8
ritalinic Acid	0.9945	8.0	0.77	2.3
7-Aminoclonazepam	0.9959	6.1	1.7	5.0
benzoylecgonine	0.9943	6.0	0.93	2.8
mdmA	0.9975	5.0	1.0	3.1
Norfentanyl	0.9970	3.1	1.1	3.4
N-desmethyl tramadol	0.9956	5.0	18	53
Tramadol	0.9962	5.4	2.1	6.3
Normeperidine	0.9937	5.9	1.8	5.3
Cocaethylene	0.9981	3.0	1.7	5.0
meperidine	0.9960	6.3	2.5	7.6
Zolpidem	0.9975	4.8	0.96	2.9
Cyclobenzaprine	0.9973	3.4	1.4	4.1
Norbuprenorphine	0.9912	6.6	3.1	9.4
fentanyl	0.9979	4.7	0.48	1.4
PCP	0.9967	4.8	0.98	2.9
buprenorphine	0.9914	6.9	1.2	3.5
Oxazepam	0.9981	2.5	0.61	1.8
methadone	0.9932	6.8	0.56	1.7
Nordiazepam	0.9970	4.1	1.7	5.0
α-hydroxyalprazolam	0.9922	5.6	6.0	18
Alprazolam	0.9937	3.8	3.9	12
Lorazepam	0.9984	3.7	0.86	2.6
Amitriptyline	0.9983	3.6	1.8	5.3
Temazepam	0.9954	4.3	3.0	8.9
11-Nor-Carboxy-ThC	0.9985	1.6	1.4	4.1



如图所示：DPX -RP/WAX Tips 单次提取酶解后尿液分析物的回收率。相关化合物包括阿片类药物、苯二氮卓类药物、常见滥用药物、非阿片类镇痛药、抗惊厥药、镇静催眠药、兴奋剂、抗抑郁药和代谢物。