Tip-on-Tip™ 尿液过滤

重点：减少手动操作时间，高重复性，高通量，无缝集成

目的及意义

- 证明 DPX 低孔隙过滤枪头在分析之前对 β-葡萄糖醛酸酶和颗粒物的去除效用
- 快速检测方法有利于延长 LC 柱使用寿命并减少仪器维修
- 提高稀释和酶解方法的可靠性以减少药物损失
- 在 5 分钟内处理多达 96 个样品，替代劳动密集型过滤板或离心步骤

方法

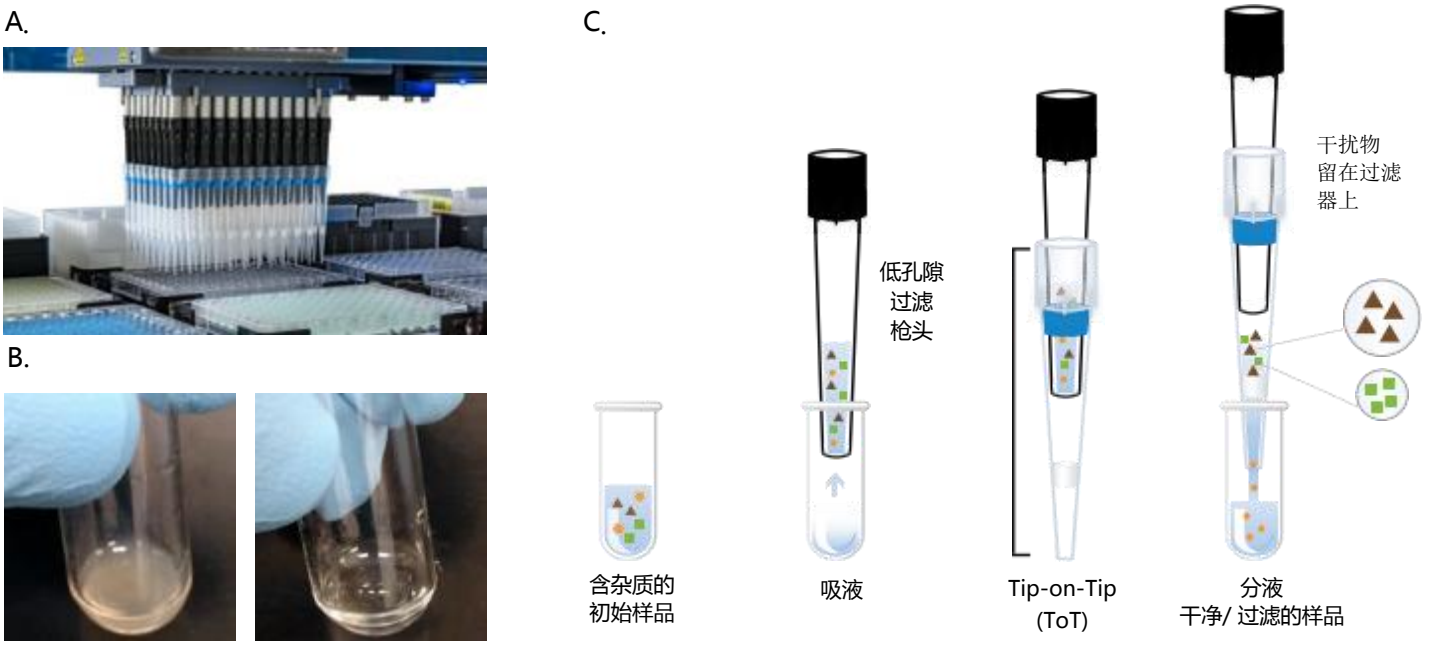


图 1.

A. 所有的样品准备工作都是在 Nimbus 96 上进行的，如图所示.

B. 经 ToT 过滤前后的原 β-葡萄糖醛酸酶尿液样品对比图

C. 示意图表示 ToT 过滤工作流程。样品首先用甲醇进行稀释。过滤液进行 LC-MS/MS 分析前用水稀释。

采用 ToT 技术对水解后的尿液样品进行 DPX 低孔（< 1 mm）过滤枪头过滤。ToT 过滤方法包括吸入水解后尿样， 用甲醇稀释（比率不同），连接过滤枪头，然后通过过滤器将溶液排出到干净的孔板中。 大多数实验室会需要用水稀释到最终合适的甲醇百分比。稀释和酶解方法通常包括一些过滤或离心步骤，以避免堵塞 LC 柱。ToT 过滤提供了一种自动化高通量方法替代劳动密集型过滤板及离心步骤。 此外，它同时可去除 β-葡萄糖醛酸酶，以最大限度地减少常见分析化合物的损失，如治疗和滥用药物。

评价了该方法对 β-葡萄糖醛酸酶去除率、滤液体积重现性和对分析物回收率的影响。

结果和讨论

β-葡萄糖醛酸酶的去除

使用 Bradford 测定法和 UPLC-DAD 联合评估了两种市售的 β-葡萄糖醛酸酶 。在样品中加入不同量的甲醇以增强对 β-葡萄糖醛酸酶的去除。原 β- 葡萄糖醛酸酶尿样在 ToT 过滤之前和之后的可视化表示如图 1.B 所示。其他纯化的 β- 葡萄糖醛酸酶去除如图 2 所示。图 2 突出显示了色谱峰强度随着甲醇浓度的增加而减弱，这三种波长分别为 215 nm，280 nm 和 254 nm。 表 1 总结了如图 2 所示以峰面积相对于对照组计算的平均去除率的研究。1:1 甲醇稀释比例可使 β-葡萄糖醛酸酶的去除率大于 75 % 。提高甲醇含量可使回收率达到 90 % 以上。

过滤体积重现性

采用 ToT 法测定 200 µL 1:1 甲醇水溶液中的甲醇含量，并对每孔进行重量分析，评价了低孔隙度过滤枪头固有的死体积和滤液体积的变化。 这些重量到体积的转换如图 2 所示。平均过滤体积为 176 µL，相当于低孔隙过滤枪头死体积为 24 µL。此外，整个孔板体积的变异系数（% CV）为 1.9 % 。

常见分析物回收

最后，对尿液（治疗/滥用药物）中感兴趣的常见分析物在 ToT 方法中的回收率进行评估。化合物在 1:1 甲醇: 水中的回收结果如图 4 所示。滤液用水稀释后用 LC-MS/MS 进行分析。过滤前甲醇含量的任何增加只会有助于提高回收率和 β-葡萄糖醛酸酶的去除。

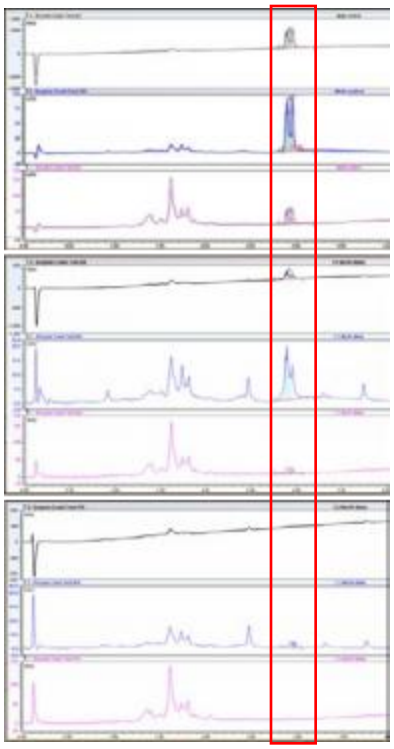


图 2. 尿液过滤去除 β-葡萄糖醛酸酶

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	175	178	177	181	179	180	177	175	172	177	177	169
B	179	170	176	179	178	172	175	168	177	183	173	171
C	182	176	181	172	181	176	184	175	182	178	181	172
D	177	175	179	177	174	175	179	171	172	178	174	172
E	179	174	183	171	178	178	175	175	176	173	179	172
F	177	180	177	176	167	180	172	174	174	178	173	174
G	178	178	172	176	174	176	174	172	174	182	178	175
H	178	181	178	176	173	176	177	179	176	178	174	177

图 3. 在 96 孔板上过滤体积变化

平均去除百分比			
	215 nm	280 nm	254 nm
1:3 甲醇	96	94	90
1:2 甲醇	100	97	100
1:1 甲醇	76	77	78

表 1. 在 3 种波长下不同甲醇比对 β- 葡萄糖醛酸酶去除效果的比较。

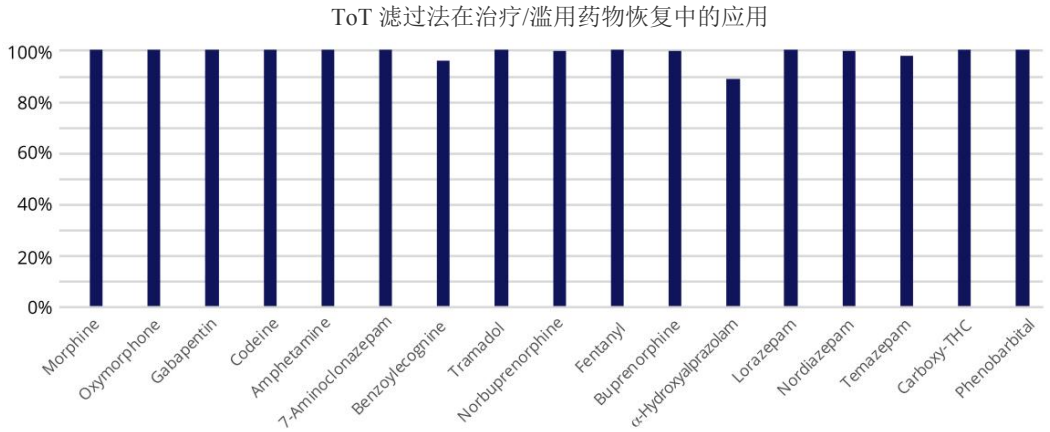


图 4. 化合物回收率的结果。

无锡微色谱生物科技有限公司

地 址：江苏省江阴市月城镇北环路 19 号
电 话：17715681752
邮 箱：custserv@micro-sep.com

MicroSep Biotechnology LLC

ADD: 2411 Monroe ST, Columbia, SC, USA
Phone : 001-803-767-8196
Web: www.micro-sep.com