MicroSep 无锡微色谱生物科技有限公司 WuXi MicroSep Biological Science Co.,Ltd

新型的 TIP-ON-TIP 法快速自动化沉淀蛋白

BLOOD TIP-ON-TIP

TECHNICAL NOTE

血液分析的难点通常是样品制备。 我们研发了种新颖的、正在申请专利的自动化方法，该方法使用宽口径 tip混合，然后 tip内过滤，作为蛋白质沉淀和离心的替代方法。 宽口径tip将样品溶液与有机溶剂充分混合，可以高效的沉淀蛋白质。 然后将含有沉淀样品溶液的宽口径 tip安装到过滤 tip上。 样品溶液通过过滤tip释放到一个干净的孔板中分析或下一步样品制备。 在过滤过程中为了更好的纯化样品，可以加入各种固相萃取吸附剂。

我们提出了三种过滤方案：只过滤、C18吸附剂或磷脂去除吸附剂。只过滤是代谢组学和药物研发的理想选择，或用于需要在过滤后进行额外样品制备的样本。与 C18 吸附剂结合的基质成分不会被引入 LC-MS/MS 系统，吸附剂起到保护柱的作用。添加磷脂去除吸附剂是消除离子抑制效应的理想方法（1-3）。该过程可以在5分钟内完成血液蛋白的沉淀、过滤并且可以同时净化多达 96 个样品，大大提高了血液分析的效率并简化了血液分析过程。该方法易于自动化，并且不需要离心机或正压歧管。

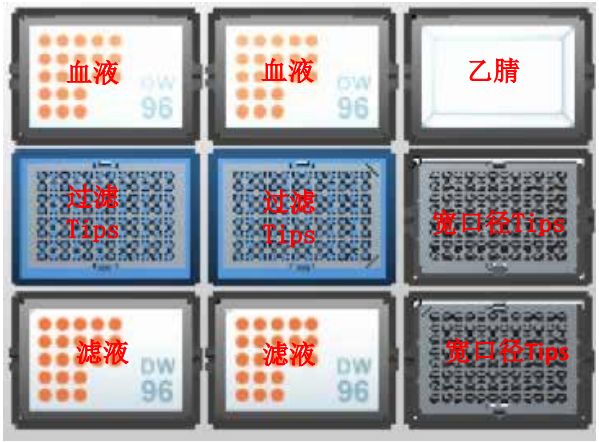


图1. DPX Tip-On-Tip自动化样品制备桌面布局。

仪器与方法

所有药物标准品均购自 Ceril-liant 公司（ Round Rock, TX ） 。 Thermo TSQ VantageTM 三重四极杆质谱仪（Milwau- kee, WI）联合Agilent 1260 系列 HPLC（Agilent Technologies, Santa Clara, CA）分析样品，色谱柱： Agilent Poroshell EC-C18 柱(3.0 × 50 mm, 2.7μm)，柱温：50°C。使用双轨

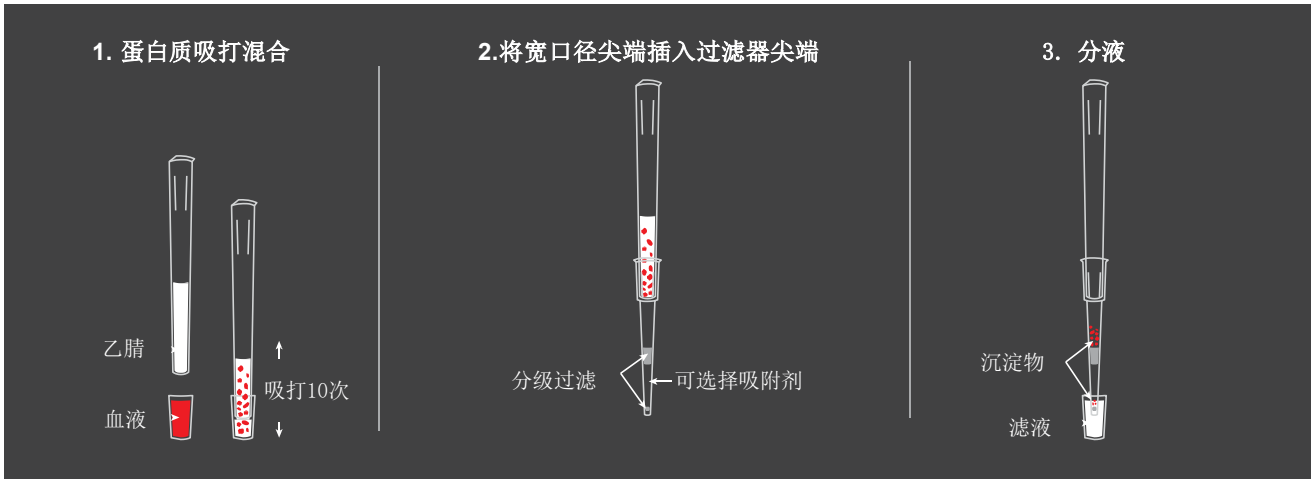


图2. 血液中DPX Tip-On-Tip法蛋白沉淀示意图。

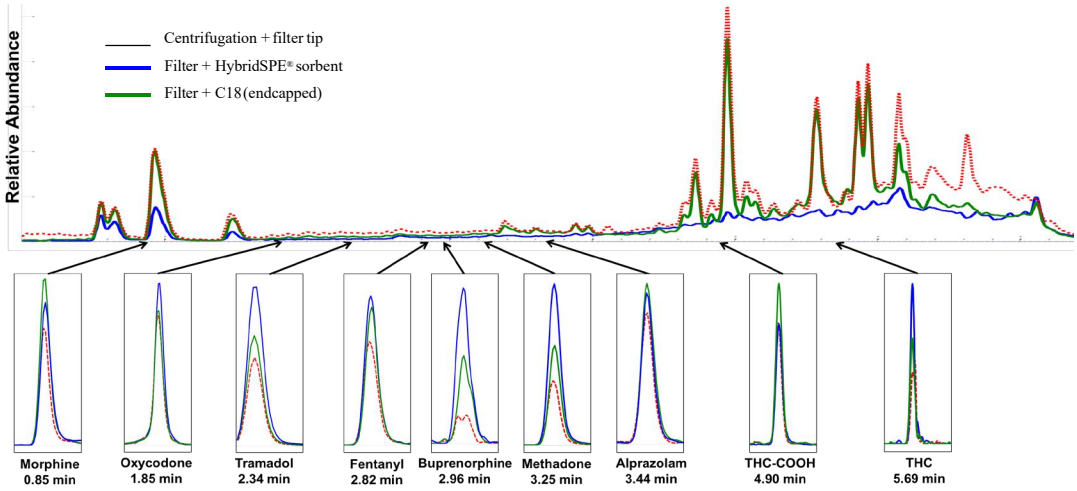


图3. 上：LC/MS总离子色谱图（m/z = 200-1500 u）。下：从40种药物混合物中提取的LC-MS/MS目标化合物离子色谱图。

GERSTEL MPS 自动进样器（Linthicum, MD）6 通（0.25mm）Cheminert C2V 进样阀（Houston, TX）注射10µL样品。 柱子流速为0.65 ml/min。 流动相：0.1% 甲酸水溶液（A）和0.1% 甲酸乙腈溶液（B）。梯度程序：5% 的B，保持 0.2 分钟；在 5.1 分钟时升至 95% 的B，保持 1 分钟；然后再降至 5% 的 B，总运行时间为 7.2 分钟。 质谱仪参数：电喷雾：4000V；辅助气体：8psi；鞘内气体：30psi；毛细管温度：300°C。

自动化平台装载有一个每孔 100 µL 空白混合血样的 96 孔板，一个乙腈储液槽（含 5% 乙酸用于 HybridSPE® 吸附剂），一个空白孔板，DPX 过滤 tips 和1mL宽口径 tips。图 1 显示了在自动化平台上准备两个连续的孔板。 图 2 DPX Tip-On-Tip 使用方法。 滤液经溶剂蒸发后，用 100 µL 10% 甲醇水溶液复溶，进样。过滤 tips 含有 25 mg HybridSPE® 吸附剂和 10 mg C18 吸附剂。

结果与讨论

之前的研究实验表明，与 30S 涡旋混合相比，宽口径 tips 重复吸打乙腈和血液可以提供稳定的药物回收率。这表明高效的蛋白质沉淀可以通过带有简单移液操作的自动化液体处理设备来完成。为了去除沉淀物，我们还发现，宽口径 tips 可以很容易安装到一个较小的过滤tips 上，以提供过滤步骤，而不需要离心机或正压歧管。

在这项研究中，我们将乙腈与含有 40 种滥用药物的 50 ng/ml 全血用宽口径 tips 混合。图 3 乙腈沉淀全血的 LC/MS 总离子流色谱图。色谱图显示了与蛋白质沉淀后的血液基质峰。红色虚线图是离心后的样品，与没有任何吸附剂的过滤 tip 相同。用 LC-MS/MS 分析的 40 种药物都很容易被检测到，即使基质中有高的背景峰。正如提取的离子色谱图中示的，即使没有净化，峰值强度也很好，信噪比也可以接受。毫无疑问，使用 C18（绿色图）可以减少背景和基质峰。 虽然使用 C18 对某些药物的回收率有影响，但我们的 Tip-On-Tip 方法可以通过阻止柱子和电离源中基质组分的引入和积累来保护 LC/MS 系统（图4）。

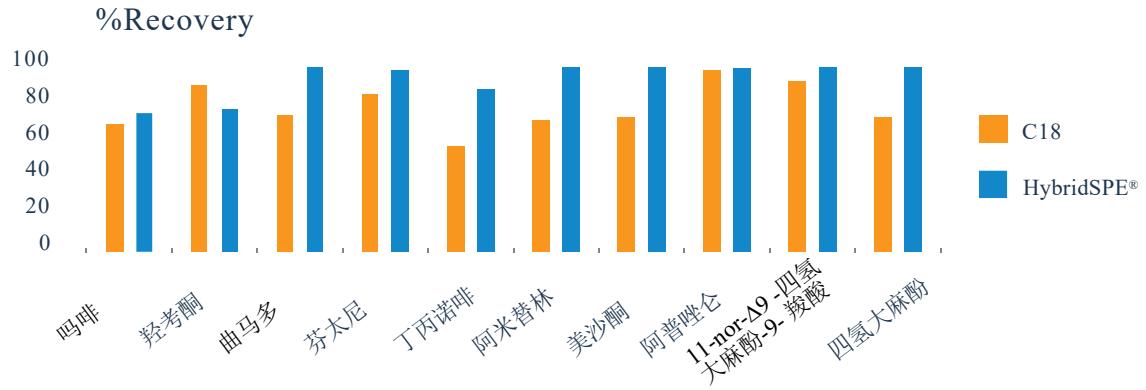


图4. 使用 C18 和 HybridSPE® 吸附剂在过滤 tips中分析 40 种药物中的代表性化合物的回收率（使用基质匹配的标准物计算蛋白质沉淀后）。

药物回收率可以通过增加 tips 中溶剂量或减少 C18 吸附剂量来提高。二氧化硅的活性位点可能会降低一些商用 C18 的回收率。通过简单地添加酸来提高碱性药物在溶液中的溶解度可能会改善这一情况。未来将进行更多的工作来确定最佳参数。尽管如此，这种方法对大多数研究的分析物提供了可接受的回收率（>70%）。

我们还在过滤 tips 中加入了 HybridSPE® 吸附剂（参考文献如下）。当使用 100% 的乙腈时，碱性分析物的回收率很低；然而，加入 5% 乙酸后，药物的回收率大大提高了。如图 3（蓝色图）所示，总离子色谱图（LC/MS扫描）的基线被大大降低。背景减少导致离子抑制减弱，峰值强度更高，如提取的离子色谱图所示（图3）。

结论

目前我们正在评估 Tip-On-Tip 方法，用于分析血清中的维生素 D 代谢物、血清和血浆中的睾酮和其他类固醇、全血中的免疫抑制剂，以及法医毒理学分析中的全血综合筛选。 其他应用包括代谢组学和固体器官标本的分析。

Tip-On-Tip 过滤技术适用于各种不同的混合物。可以加入定制的吸附剂，以促进样品纯化和提高灵敏度。

References

1. Aurand, Craig “Isolation and LC-MS Characterization of Illicit Bath Salts in Urine” Reporter US Volume 30.3
2. Lu, Xiaoning; Ye, Michael “Enrichment of Phospholipids in Biological Samples Using HybridSPE-PL” Reporter US Volume 28.3
3. Aurand, Craig “Minimizing Phospholipid Matrix Effects in the HILIC LC-MS” Reporter US Volume 28