

## Простые и быстрые методики подготовки биологических жидкостей для ЖХ-МС-анализа

### Технический обзор

#### **Продукты для жидкостной экстракции на субстрате (ЖЭС) Agilent Chem Elut позволяют усовершенствовать методику жидкостной экстракции для биоаналитических исследований.**

- Увеличение эффективности высокопроизводительных исследований в области изучения метаболизма, фармакокинетики и биологического анализа.
- Неизменно воспроизводимое разделение органической фазы.
- Использование простых общих методик для образцов всех типов.

Для высокопроизводительного биологического анализа требуются быстрые, готовые к использованию методики, обеспечивающие надежные результаты. Жидкостная экстракция (ЖЭ) часто используется в биоаналитических исследованиях благодаря экономичности, простоте разработки методик и общей эффективности для МС-анализа [1]. Продукты ЖЭС Chem Elut позволяют усовершенствовать методику жидкостной экстракции за счет упрощения методик для всех типов образцов и устранения проблем с разделением фаз и образованием эмульсий. При использовании Chem Elut нужно просто поместить пробу в патрон с самотеком и экстрагировать ее с помощью растворителя. В отличие от традиционной жидкостной экстракции встряхивания не требуется и воспроизводимость увеличивается. Подготовка образцов крови, мочи или других биологических жидкостей занимает минимум времени, обеспечивает воспроизводимость и позволяет избежать образования эмульсий. 96-луночный планшет или отдельные патроны дают возможность работать с пробами разного размера и усовершенствовать подготовку проб.



## Методика экстракции для водных проб и образцов биологических жидкостей

### Шаг 1

Перенесите водную пробу в сухой патрон.



Патроны Chem Elut заполнены специально очищенным сорбентом с частицами определенного размера на основе диатомовой земли.

### Шаг 2

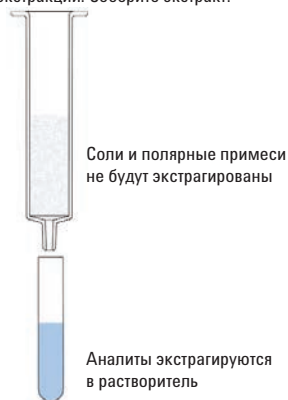
Инкубация 3-5 минут.



Водный образец адсорбируется и распределяется тонкой пленкой по поверхности твердого носителя.

### Шаг 3

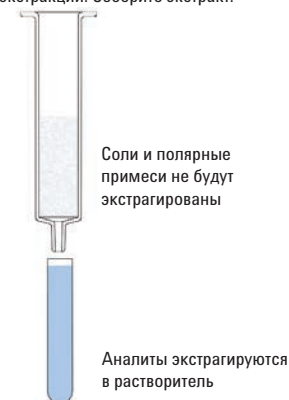
Добавьте первую аликвоту органического растворителя для экстракции. Соберите экстракт.



По мере прохождения растворителя по картриджу аналиты экстрагируются из водного слоя с показателями, сопоставимыми с экстракцией ж/ж. Так же предупреждается появление эмульсии.

### Шаг 4

Добавьте вторую аликвоту органического растворителя для экстракции. Соберите экстракт.



Промывка двумя аликвотами вместо одной повышает эффективность экстракции и извлечения. Собранные элюенты можно анализировать напрямую или высушить для последующего воссоздания.

## Общие методы подготовки проб

Перечисленные ниже общие методики могут использоваться для множества биологических жидкостей, включая кровь, плазму, сыворотку, мочу и желчь. Выберите методику на основе кислотно-основных свойств конкретного определяемого вещества.

### Нейтральные аналиты

1. Выберите патрон Agilent Chem Elut, соответствующий общему объему образца. Нанесите образец на соответствующий патрон Chem Elut. Примечание. Поскольку образец не протекает сквозь сорбент, а адсорбируется, необходимо подождать 3–5 минут для завершения процесса.
2. Нанесите на патрон Chem Elut не смешивающийся с водой растворитель для экстракции. Используйте две аликвоты, каждая из которых равна объему исходного образца. Обычно используются дихлорметан, этилацетат, метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ), метилэтилкетон (МЭК) и бутилацетат. Для полярных аналитов, плохо растворимых в этих растворителях, можно разбавить растворитель изопропанолом. Убедитесь, что полученный экстракционный раствор не смешивается с водой.

3. Соберите растворитель, прошедший через патрон Chem Elut. После этого можно выполнить анализ непосредственно экстракта или высушить его и растворить в подвижной фазе ЖХ или в подходящем растворителе для ГХ.

### Основные аналиты

Разбавьте образец равным объемом основного буфера. Для аминов и других слабоосновных аналитов рекомендуется использовать в качестве буфера 1 М аммиачные растворы с pH 9-10. Следуйте описанной выше процедуре для нейтральных аналитов, выбрав патрон Chem Elut в зависимости от объема образца с учетом буфера.

### Кислотные аналиты

Разбавьте образец равным объемом кислого буфера. Для карбоновых кислот и других слабокислых аналитов рекомендуется использовать в качестве буфера 1 М фосфатные растворы с pH 2-3. Следуйте описанной выше процедуре для нейтральных аналитов, выбрав патрон Chem Elut в зависимости от объема образца с учетом буфера.

## **96-луночные планшеты Agilent Chem Elut упрощают подготовку проб благодаря быстрой параллельной обработке и отсутствию проблем с разделением фаз.**

96-луночный планшет Chem Elut (Combilute) рекомендуется использовать при определении концентрации основных лекарственных препаратов в биологических жидкостях для фармакокинетических исследований [2]. Планшет Combilute может быть легко приспособлен для автоматизированных методик, исключает неопределенность границ фаз и позволяет полностью выполнять экстракцию на автоматизированных приборах для обработки жидкостей без вмешательства оператора.

1. Отберите пипеткой образец плазмы (0,2 мл), добавьте внутренний стандарт (500 нМ, 0,05 мл) и 1% (масса/объем) раствора карбоната аммония, pH 9,5 (0,2 мл) в 96-луночные планшеты для сбора образцов.
2. Встряхните на вортексе (ручной метод) или перемешайте, чередуя циклы аспирации и спуска жидкости с помощью наконечников для пипеток устройства для работы с жидкостями (автоматический метод).
3. Перенесите смеси проб в 96-луночный планшет Combilute, расположенный над 96-луночным планшетом для сбора образцов на 2 мл. Подождите 3-5 минут для полной адсорбции проб. Важно! Пробы не проходят через слой сорбента, но адсорбируются материалом сорбента.
4. Выполните промывку с помощью 2,5 мл МТБЭ, позволив растворителю самотеком стечь через каждую ячейку. Для некоторого ускорения потока можно использовать очень слабый вакуум (< 3,4 кПа). Более высокий выход часто можно получить, используя несколько аликвот меньшего объема (т. е. 2 аликвоты × 1,25 мл МТБЭ или другого растворителя).
5. Выпарите экстракты до сухого состояния в атмосфере азота при 25 °С.
6. Растворите остаток в 0,1 мл подвижной фазы. Введите полученный раствор в систему ЖХ-МС для анализа.

## **Agilent Chem Elut идеально подходит для быстрой обработки крови или ее компонентов.**

С помощью Chem Elut можно легко и быстро экстрагировать лекарственные препараты из крови. В статье [3] сообщается об экстракции 33 бензодиазепинов, метаболитов и аналогичных соединений из цельной крови со средними значениями коэффициентов извлечения > 75%, средним квадратичным отклонением 9,2% и средними значениями пределов обнаружения и пределов количественного определения 1,7 и 5,7 нг/мл соответственно.

1. Добавьте 1 мл цельной крови, разбавленный 50 мл раствора внутреннего стандарта в метаноле, в патрон Chem Elut емкостью 3 мл с буферным pH 9 (кат. номер 12198005). Добавьте в патрон 1,5 мл дистиллированной воды. Подождите 3-5 минут, пока вся жидкость не впитается в сорбент.
2. Промойте патрон тремя порциями метил-трет-бутилового эфира (МТБЭ) по 4 мл.
3. Выпарите элюент при 50 °С, растворите остаток в 100 мл подвижной фазы и введите раствор в ЖХ-МС.

## **Agilent Chem Elut можно использовать для разнообразных типов биологических образцов, не изменяя методику.**

В данном примере мелатонин экстрагируется из плазмы или спинномозговой жидкости [4] с высокими коэффициентами извлечения (> 90%), хорошей воспроизводимостью (коэффициент вариации < 6%), низкими пределами обнаружения (0,5 пг/мл на основе проб объемом 1 мл).

1. Добавьте трихлоранизол (ТСА) (60 мМ, 300 мкл) в пробы плазмы или спинномозговой жидкости (1 мл). Охладите смесь в ледяной бане в течение 10 минут и отцентрифугируйте (5 000 g, 10 минут). Доведите pH надосадочной жидкости до 7,4, добавив NaOH (1 М, 20 мкл).
2. Добавьте водный образец в верхнюю часть патрона Chem Elut емкостью 3 мл. Дождитесь впитывания пробы сорбентом в течение 3-5 минут.
3. Экстрагируйте мелатонин, используя 2 порции дихлорметана объемом 4 мл.
4. Выпарите объединенные элюенты на водяной бане при температуре 37 °С. Растворите остаток в 60 мкл подвижной фазы, вкложите пробу 40 мкл.

## Литература

1. “Жидкостная экстракция является общепризнанным методом получения экстрактов, содержащих меньшее количество примесей, которые могут вызывать ионную супрессию, чем в результате осаждения белков или ТФЭ”. См., например, Bonfiglio, R., King, R. C., Olah, T. V. Merkle, K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 13, 1175-1185 (1999).
2. Это стандартный метод. Различные варианты см. также в статье Peng S.X., Branch, T.M. King, S.L., *Anal Chem.* 73, 708-714 (2001).
3. Smink, B.E. в *соавт. Journal of Chromatography B*, 811 (2004) 13 20.
4. Rizzo, V. Porta, C. Moroni, M. Scoglio, E. Moriatti, R. *J. Chrom. B*, 774, 17-24 (2002).

## Информация для заказа

Каталожный номер	Описание	Единицы/упаковка
65401507	96-луночный планшет, содержащий 200 мг сорбента Hydromatrix на лунку	1
12198001	Agilent Chem Elut, объем воды 0,3 мл	100
12198002	Agilent Chem Elut, объем воды 0,1 мл	100
12198003	Agilent Chem Elut, объем воды 3 мл	100
12198004	Agilent Chem Elut, объем воды 3 мл, предварительно доведенный до pH 4,5	100
12198005	Agilent Chem Elut, объем воды 3 мл, предварительно доведенный до pH 9	100
12198006	Agilent Chem Elut, объем воды 5 мл	100
12198007	Agilent Chem Elut, объем воды 10 мл	100
12198008	Agilent Chem Elut, объем воды 20 мл	100
12198009	Agilent Chem Elut, объем воды 50 мл	50
12198010	Agilent Chem Elut, объем воды 100 мл	25

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и технические характеристики в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2013.  
Напечатано в США  
19 февраля 2013 г.  
SI-2500



**Agilent Technologies**