



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113725063 B

(45) 授权公告日 2024.09.20

(21) 申请号 202110914083.5
(22) 申请日 2016.02.08
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113725063 A
(43) 申请公布日 2021.11.30
(30) 优先权数据
62/112,799 2015.02.06 US
62/211,268 2015.08.28 US
(62) 分案原申请数据
201680020765.9 2016.02.08
(73) 专利权人 普度研究基金会
地址 美国印第安纳州
专利权人 欧阳证 任跃 王骁
(72) 发明人 欧阳证 任跃 王骁

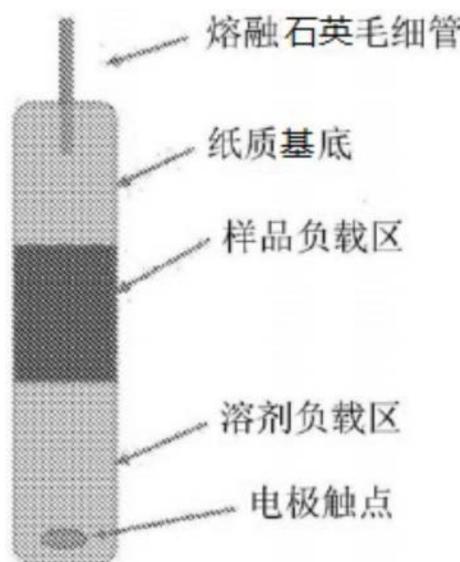
(74) 专利代理机构 北京汇铮律师事务所 11973
专利代理师 唐宁
(51) Int.Cl.
H01J 49/04 (2006.01)
H01J 49/26 (2006.01)
(56) 对比文件
CN 102414778 A, 2012.04.11
CN 102768236 A, 2012.11.07
审查员 陈茂兴

权利要求书1页 说明书10页 附图15页

(54) 发明名称
探针、盒、系统和样本分析的方法

(57) 摘要

本发明涉及探针、系统、盒及方法。在某些实施例中,本发明提供了一种探针,其包括多孔材料和耦合到多孔材料的末端部分的中空构件。



1. 一种探针, 包含:
 - 多孔材料, 所述多孔材料包含在所述多孔材料的末端部分内的切口; 以及
 - 被插入到所述多孔材料的切口的中空构件, 所述中空构件包含光滑的末端, 该光滑的末端被配置成邻近质谱仪的入口, 其中, 所述中空构件是具有3mm、8mm或10mm长度的毛细管;
 - 所述中空构件延伸超过所述多孔材料的末端;
 - 所述光滑的末端是通过燃烧所述中空构件的末端而获得的。
2. 根据权利要求1所述的探针, 其中, 所述多孔材料是纸。
3. 根据权利要求1或2所述的探针, 其中, 所述多孔材料还包含一种或多种化学品作为内标或用于化学衍生。
4. 一种盒, 包含:
 - 带有开放末端的外壳;
 - 以及定位在所述外壳内的根据权利要求1-3任一所述的探针;
 - 所述外壳包括通向所述探针的多孔材料的开口, 以使得样品被引入到所述探针中。
5. 根据权利要求4所述的盒, 其中, 所述外壳包含用于电极的耦接头, 以使得电场可被施加到所述探针。
6. 根据权利要求4或5所述的盒, 进一步包含从所述外壳的所述开放末端延伸的多个叉尖。
7. 根据权利要求4或5所述的盒, 进一步包含溶剂储罐。
8. 一种包含权利要求1-3任一所述的探针的用于质谱分析的系统。
9. 根据权利要求8所述的系统, 其是台式质谱仪或微型质谱仪。
10. 根据权利要求8或9所述的系统, 其包含气帘气。
11. 一种用于分析样品的方法, 所述方法包括:
 - (1) 提供根据权利要求1-3任一所述的探针;
 - (2) 使样品与所述多孔材料相接触; 在所述中空构件的末端探出的探针处生成样本的离子; 以及分析所述离子。
12. 根据权利要求11所述的方法, 其中, 步骤(2) 包括将溶剂和电场施加到所述探针以产生从所述中空构件的末端排出的所述样品的离子。
13. 根据权利要求11所述的方法, 其中, 步骤(2) 所述的分析包括将所述离子引入到质谱仪中。
14. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 所述质谱仪是台式质谱仪或微型质谱仪。
15. 根据权利要求11-14任一所述的方法, 其中, 所述样品是生物样品。

探针、盒、系统和样本分析的方法

[0001] 本申请是申请号为201680020765.9、申请日为2016年2月8日、发明名称为“探针、系统、盒及其使用方法”的中国发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及生物医药技术领域,具体的说是一种探针、盒、系统和样本分析的方法。

背景技术

[0003] 纸喷雾已被开发用于复杂样本的直接质谱分析,其已经应用于商业实验室规模的质谱仪和小型质谱仪上的样本分析。自开发以来,纸喷雾在各种应用中显示出了一系列独特的优势。例如,纸喷雾很容易实现。使用带有尖头的三角形纸基作为样本基材,并沉积液体样本以形成干燥样本点,例如干血点(DBS)。通过用溶剂湿润基材并施加约4000 V的高压来执行直接采样电离。溶剂从样本点洗脱分析物,并在基材尖端产生喷雾电离,以产生用于质谱分析的分析物离子。纸喷雾也适用于一次性样本盒的设计,这对于临床原位电离非常重要,尤其是使用质谱进行现场快速(POC)分析。使用一次性样本盒的商用纸喷雾源配件零件已经开发出来并用于临床应用。

[0004] 然而,纸喷雾有一定的局限性。纸喷雾与使用气帘气的质谱仪(例如Sciex仪器)的连接不良。纸喷雾与小型质谱仪的连接也存在问题。此外,纸喷雾探针的尖头直接影响探针的性能,制造纸张基材的批量生产过程(例如模切)在从纸张制造尖头时存在不一致的问题。

发明内容

[0005] 本发明提供了与使用气帘气的质谱仪和小型质谱仪接触良好的探针。本发明一方面将中空构件(例如,毛细管喷雾器)添加到用于纸毛细管喷雾的多孔基材(例如,纸张基材)。本文中的数据表明,本发明的探针对直接质谱分析的灵敏度和再现性具有显著的积极影响。制作纸毛细管装置,并对其几何结构、毛细管喷雾器处理以及样本处理方法的影响进行了表征。其分析性能也用小型离子阱质谱仪上的血液样品分析(例如血液样本中的治疗药物分析和西他列汀(JANUVIA)定量分析)来体现。

[0006] 本发明提供一种探针,其包括多孔材料和耦合到多孔材料的末端部分的中空构件,中空构件可由非纸材料构成。在某些实施例中,中空构件延伸到多孔材料的末端之外。多种不同类型的中空构件可与本发明的探针一起使用。示例地,中空构件可以是毛细管。类似地,本发明的探针可以与多种类型的多孔材料共用。示例地,多孔材料可以是纸张,例如滤纸。在某些实施例中,多孔材料包括材料末端部分内的切口,且中空构件适配在切口内。在某些实施例中,中空构件的末端是平滑的。

[0007] 本发明还提供一种盒,包括末端具有开口的壳体和位于壳体内部的探针。所述探针包括多孔材料和中空构件,所述中空构件耦合到所述多孔材料的末端部分,并且可操作地

对准所述壳体的末端开口。外壳可具有多种附加功能。例如,所述外壳可以包括通向所述探针的多孔材料的开口,用于将样本引入所述探针。所述外壳还可包括用于电极的耦(合)接头,使得电场可被施加至所述探针。在某些实施例中,壳体包括从壳体的末端开口延伸出的多个尖头/叉尖。在某些实施例中,壳体包括溶剂储存器/储罐。

[0008] 本发明还提供一种系统,其包括探针、耦合到多孔材料的电极和质谱仪;其中,探针包括多孔材料和耦合到多孔材料的末端部分的中空构件。本发明可使用任何类型的质谱仪。例如,质谱仪可以是台式质谱仪或小型质谱仪。质谱仪可包括一个气帘气。

[0009] 本发明还提供分析样本的方法。所述方法可涉及提供包括多孔材料和耦合到所述多孔材料的末端部分的中空构件的探针,使样本接触到所述多孔材料,在所述中空构件的末端探出的探针处生成样本的离子,并分析所述离子。生成步骤可包括向探针施加溶剂和电场。在某些实施例中,不需要使用溶剂,仅向探针施加电场就足以生成样本的离子。在某些实施例中,分析包括将离子引入质谱仪,例如台式质谱仪或小型质谱仪。本发明的方法可用于分析任何样本,例如生物样本。

附图说明

[0010] 图1A至图1E是系统的示例性设计。

[0011] 图2A至图2D是具有多个喷雾器的系统和/或具有三维样本基材的系统的示例性设计。

[0012] 图3是使用图1B所示设备和商用TSQ质谱仪分析牛血中可卡因的图。

[0013] 图4是使用如图1A所示的设备和台式Mini 12质谱仪分析甲醇中的可卡因和维拉帕米的图。

[0014] 图5是使用如图1B所示的设备和台式Mini 12质谱仪分析牛血中的可卡因的图。

[0015] 图6A示出了使用纸毛细管喷雾分析干血点的示意图。插图示出纸毛细管基材的图片。制造纸毛细管基材的方法。

[0016] 图6B示出了将毛细管插入分开的纸基材的侧视图。

[0017] 图6C示出嵌入纸张基材中间切口中的毛细管。

[0018] 图7A是原始毛细管的照片。

[0019] 图7B是烧过的毛细管的照片。

[0020] 图7C-7D示出了通过将含有100 ng/mL甲基苯丙胺的3 μ L牛全血沉积在纸基质上制备的干血点的分析。其中,图7C示出了MS/MS离子对m/z 150 \rightarrow 91的提取离子流图。图7D示出了使用原始毛细管和烧过的毛细管采集的MS/MS谱图。

[0021] 图8a示出了使用10 mm毛细管在纸基材上采集的离子流图,SRM分析m/z 455 \rightarrow 165牛全血中100 ng/mL维拉帕米。图8b示出了使用纸基材上的3mm毛细管SRM分析m/z 278 \rightarrow 233牛全血中的100 ng/mL阿米替林时采集的离子流图。每个DBS用3 μ L血样制备。

[0022] 图9A-C是纸基和纸毛细管装置发射端的照片。

[0023] 图9D示出了使用QTrap 4000对伊马替尼进行的MS/MS分析,其中伊马替尼在甲醇:水(9:1,v:v)中的浓度为50ng/mL。

[0024] 图9E示出了使用Mini 12对阿米替林进行的MS/MS分析,其中阿米替林在甲醇:水(9:1,v:v)中的浓度为20ng/mL。

[0025] 图10A示出了使用QTrap 4000采集SRM离子对m/z 278→233测试血液中200 ng/mL阿米替林的离子流图,其中使用两种不同的样本沉积方法。其中a显示中心沉积的样本,b显示边到边沉积的样本。3 μ L血样用于制备DBS。

[0026] 图10B示出了使用Mini 12和纸毛细管喷雾建立的牛全血中西他列汀的校准曲线,校准曲线采集m/z 408作为前体离子的MS/MS,使用碎片离子m/z 235的强度绘制而成。插图显示了10-500 ng/mL范围内的线性度。

[0027] 图11A示出了用于POC MS系统的示例性一次性分析套件。

[0028] 图11B示出了样本盒设计的变化,从使用纸喷雾到纸毛细管喷雾。

[0029] 图11C示出了使用纸毛细管喷雾和mini 12分析血液中的Januvia (西他列汀)。

[0030] 图11D-F示出了包含IS的建议方法,用于简单操作下的定量。

具体实施方式

[0031] 本发明涉及探针、盒、系统和用于分析置于多孔材料上的样本的方法,所述多孔材料具有喷雾电离,喷雾电离来自具有中空体(构件)和末端尖端的喷雾器。具有中空体的喷雾器可以是毛细管。示例性设计如图1A-1E和图2A-2D所示。多孔材料,如纸,可用作样本基材。空心毛细管,例如熔融石英毛细管(内径49 μ m,外径150 μ m),可与样本基材耦合(例如插入)。可将萃取溶剂加到样本基材上,并可对湿润的基材施加高压。溶剂可以在毛细作用下穿过样本基材靠向毛细管,提取沉积样本中的分析物,并将其带入毛细管。喷雾电离可以发生在喷雾器的末端,产生离子。这些离子可用于质量分析。可以使用不同内径和外径的喷雾器来优化喷雾电离。喷雾器可以由玻璃、石英、聚四氟乙烯、金属、二氧化硅、塑料或任何其他非导电或导电材料制成。

[0032] 样本基材可以是如图1A-1E和图2A-2D所示的任何形状。通常,去除样本基材上锐角,以减少从样本基材上引入的喷雾,然而,样本基材可以有角。样本基材包括多孔材料。任何多孔材料,例如聚二甲基硅氧烷(PDMS)膜、滤纸、纤维素基产品、棉花、凝胶、植物组织(例如叶子或种子)等,均可用作基材。

[0033] 示例地,基材可包括Ouyang等人(美国专利号8859956)的例子,其中每种基材的实施例全部通过引用并入本文。在某些实施例中,多孔材料是任意纤维素基的材料。在其他实施例中,多孔材料是非金属多孔材料,例如棉、亚麻、羊毛、合成纺织品或由玻璃微纤维制成的玻璃微纤维滤纸。在某些实施例中,基材是植物组织,例如植物的叶、皮或树皮、水果或蔬菜、植物的果肉、水果或蔬菜或种子。在其他实施例中,多孔材料是纸。纸张的优点包括:成本(纸张便宜);它完全商业化,其物理和化学性质可以调整;它可以过滤液体样本中的颗粒物(细胞和灰尘);易于成型(例如,易于切割、撕开或折叠);液体在毛细作用下在其中流动(例如,无需外部抽真空和/或电源);而且是一次性的。在某些实施例中,探针与溶剂流保持离散(即,分离或不接触)。代替地,将样本点多孔材料上,或者将多孔材料弄湿并擦拭包含样本的表面。

[0034] 在特定实施例中,多孔材料为滤纸。示例地,滤纸可包括纤维素滤纸、无灰滤纸、硝化纤维滤纸、玻璃微纤维滤纸和聚乙烯滤纸。可以使用任何孔径的滤纸。示例地,孔径可包括1级(1 μ m)、2级(8 μ m)、595级(4-7 μ m)和6级(3 μ m),孔径不仅会影响喷雾材料内部液体的传输,还可能会影响尖端泰勒锥的形成。最佳孔径将产生稳定的泰勒锥,并减少液体蒸

发。滤纸的孔径也是过滤的一个重要参数,即滤纸充当即时预处理装置。商用再生纤维素超滤膜的孔径在低nm范围内,其设计可保留小至1000 Da的颗粒。市售超滤膜的分子量筛截范围为1000 Da至100000 Da。

[0035] 在其他实施例中,对多孔材料进行处理,以在多孔材料中产生微通道,或用于增强本发明探针的材料性能。例如,纸可以通过图案化的硅烷化工艺在纸上产生微通道或结构。例如,此类工艺涉及将纸张表面暴露于十三氟-1,1,2,2-四氢辛基-1-三氯氢硅中以导致纸张的硅烷化。在其他实施例中,软光刻工艺用于在多孔材料中产生微通道或增强用作本发明探针的材料特性。在其他实施例中,在纸中创建疏水捕获区域以预浓缩低亲水性的化合物。

[0036] 疏水区域可通过光刻、印刷法或等离子体处理在纸上形成图案,以获得侧向特征为200-1000 μm 的亲水通道。参见Martinez等人(Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 1318-1320);Martinez等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008, 105, 19606-19611);Abe等人(Anal. Chem. 2008, 80, 6928-6934);Bruzewicz等人(Anal. Chem. 2008, 80, 3387-3392);Martinez等人(Lab Chip 2008, 8, 2146-2150);以及Li等人(Anal. Chem. 2008, 80, 9131-9134),其中每一项的内容均完整引用并入本文。这种纸基设备上的液体样本可以在毛细管作用的驱动下沿着亲水通道流动。

[0037] 改性表面的另一个应用是根据化合物与表面和溶液的不同亲和力来分离或浓缩化合物。一些化合物倾向于吸附在表面上,而基质中的其他化学物质更倾向于留在水相中。通过洗涤,样本基质可以去除,而目标化合物保留在表面上。目标化合物可在稍后时间通过其他高亲和性溶剂从表面去除。重复这个过程有助于除盐并浓缩原始样本。

[0038] 在某些实施例中,将化学品应用于多孔材料以改进多孔材料的化学性质。例如,可以使用化学品来实现对具有不同化学性质的样本组分进行差异保留。此外,可以使用化学品来减少盐和基质效应。在其他实施例中,向多孔材料中添加酸性或碱性化合物,以调整样本点样的pH值。调节pH值对于血液等生物液体的改进分析尤其有用。此外,可以使用对所选分析物实施即时化学衍生法的化学品,例如将非极性化合物转化为盐,以实现高效电喷雾电离。

[0039] 在某些实施例中,用于修饰多孔材料的化学品为内标(物)。内标物可并入材料中,并在溶剂流动期间以已知速率释放,以便为定量分析提供内标物。在其他实施例中,可用化学品对多孔材料进行修饰,从而在质谱分析之前对相关分析物进行预分离和预浓缩。

[0040] 在某些实施例中,多孔材料与溶剂流(例如连续的溶剂流)保持离散(即,分离或不接触)。代替地,将样本点在多孔材料上,或从包括样本的表面擦拭到多孔材料上。将离散量的萃取溶剂引入探针外壳的端口,以与基材上的样本相互作用,并从基材上提取一种或多种分析物。电源可操作地耦合到探针壳体,以向包括萃取分析物的溶剂施加电压,以产生随后进行质量分析的分析物离子。从多孔材料/基材中提取样本,无需单独的溶剂流。

[0041] 将溶剂应用于多孔材料以协助分离/萃取和电离。可以使用与质谱分析兼容的任何溶剂。在特定实施例中,优选溶剂包括用于电喷雾电离的溶剂。

[0042] 示例性溶剂包括水、甲醇、乙腈和四氢呋喃(THF)的组合。有机物含量(甲醇、乙腈等与水的比例)、pH值和挥发性盐(如醋酸铵)可因待分析样本而异。例如,像药物伊马替尼这样的碱性分子在较低的pH值下被更有效地提取和电离。没有可电离基团但有许多羰基的

分子,如西罗莫司,由于形成加合物,在溶剂中用铵盐电离更好。

[0043] 图1B-1C示出样本基材的两种备选设计。图1D-1E示出两种典型设计的剖面图。毛细管可插入样本基材中或在两层样本基材之间。图2A示出包括多个毛细管喷雾器和单个平面状的样本基材的构造。图2B示出圆柱形基材的构造。图2C示出锥形基材的构造。图2D示出与多个喷雾器连接的样本基材的示例。图3示出使用如图1B所示的设备和商用TSQ质谱仪分析牛血中的可卡因。图4示出使用如图1A所示的设备和台式Mini 12质谱仪分析甲醇中的可卡因和维拉帕米。图5示出使用如图1B所示的设备和台式Mini 12质谱仪分析牛血中的可卡因。

[0044] 在另一实施例中,该装置可包括与用于直接采样电离的样本基材集成的喷雾器。样本基材可以是多孔的。喷雾器可以是空心毛细管或实心喷头。另一方面,也可以通过毛细管效应直接从毛细管的末端采集流体样本。可以湿润基材,作为产生喷雾电离所需高压的导体。另一方面,可以去除毛细管的涂层以允许光照,从而在毛细管内的溶液中进行光化学反应。另一方面,样本基材可耦合多个喷雾器。多个喷雾器可以位于样本基材的同一侧,也可以耦合在样本基材的不同侧,其中一些用作喷雾器,而另一些用作将样本、溶剂和试剂转移到基材的通道。另一方面,可以覆盖或密封样本基材,以防止萃取溶剂蒸发。

[0045] 样本盒和套件

[0046] POC MS系统对MS应用的改革在于该系统对于未受过化学分析培训的人员(如护士和医生)易用。尽管待开发的小型离子阱质谱仪用途广泛,适用范围广泛,但特殊的采样套件以及特殊的操作用户界面对于简化最终用户的操作非常重要。图11A示出示例性样本盒。该盒包括末端具有开口的壳体。本发明的探针位于外壳内。所述探针包括多孔材料和中空构件,所述中空构件耦合到所述多孔材料的末端部分,并且可操作地对准所述壳体的末端开口。外壳可能有许多附加功能。例如,所述外壳可以包括通向所述探针的多孔材料的开口,从而可以将样本引入所述探针。所述外壳还可包括用于电极的耦合接头,从而施加电场至所述探针。在某些实施例中,壳体包括从壳体的末端开口延伸的多个尖头。在某些实施例中,壳体包括溶剂储存器。关于外壳的示例细节可参见PCT/US12/40513,其全部内容引用并入本文。

[0047] 示例性采样套件中的组件如图11A所示。其中有一个样本盒、一个采样毛细管和一小瓶溶剂。通过毛细管效应,采样毛细管可用于以毛细管体积控制采集生物流体样本的量。这种类型的毛细管在医学水平上可用于各种体积,例如5、10、15 μL (Drummond Scientific Company, Broomall, Pa.)。这特别适用于手指刺取血样。然后将样本放置在样本盒上,立即进行分析,或干燥形成干燥的样本点供以后分析。

[0048] 萃取/喷雾溶剂可以装在一个小瓶中,与滴眼液类似。只需用手挤压瓶子,就可以相对稳定地取出少量溶剂。在之前的纸喷雾试验中,没有观察到由于溶剂量的变化而对灵敏度或定量精密度产生的不利影响,只要没有通过萃取/喷雾溶剂引入内标物。使用瓶装溶剂与盒和毛细管一起供应可以提高制造专用试剂套件的灵活性。用于不同用途的溶剂,如甲醇、乙腈、乙酸乙酯,以及它们与其他溶剂和试剂的组合,可以用优化的配方生产,并为目标分析提供最佳性能。样本盒和取样毛细管可以装在同一个包装中,而瓶装溶剂可以单独提供,可以与多个盒/毛细管包装一起使用。或者,可以提供一次性使用的小的溶剂试剂套装,该试剂套装可以与盒和毛细管放在同一个包装中。

[0049] 对于样本盒,使用带有插入式熔融毛细管的纸张基材(图11B)。在之前的测试中发现,纸质喷雾探针尖端的锋利度和纸张基材的厚度对喷雾过程的去溶剂化有显著影响,对于商用质谱仪来说,这不是一个问题,但对于具有较少的阻碍气压界面的小型系统来说,这是一个问题。与厚度为0.5 mm的Whatman ET31相比,厚度为0.18 mm的Whatman 1级薄纸对Mini 12的灵敏度至少高出5倍。然而,当被弄湿时,薄纸变软,不适合组装成盒。对于工业大规模生产过程来说,制造纸基材的尖头仍然是一个挑战。使用如提取喷雾中控制的锋利玻璃尖端,可以保证nanoESI的电离效率,但提取喷雾的分析方案不像纸喷雾那样方便用户。

[0050] 本发明的探针将玻璃喷嘴与用于原位电离的纸基材结合。通过燃烧去除150/50 μ m外径/内径、10 mm长的熔融石英毛细管的涂层。然后将毛细管插入ET31基材中作为喷雾头。该设计充分利用了纸喷雾中的样本清洁过程,并在萃取喷雾中使用了锋利的喷雾头,从而提高了电离效率。下面的数据表明获得了与1级基材相同的灵敏度。在使用Mini 12对血液样本中的西他列汀(JANUVIA,与默克公司合作)进行分析时,获得了3 ng/mL的LOD和10 ng/mL的LOQ。

[0051] 小型质谱仪

[0052] 在某些实施例中,质谱仪是小型质谱仪。例如,Gao等人(Z. Anal. Chem. 2006, 78, 5994-6002)中描述了一种示例性小型质谱仪,其内容通过引用并入本文。与具有数千瓦功率的用于实验室规模的仪器的抽真空系统进行比较,小型质谱仪通常具有较小的抽真空系统,例如,Gao等人所述的系统中,18 W的抽真空系统只有一个5 L/min(0.3 m³/hr)的隔膜泵和一个11 L/s的涡轮泵。其他示例性小型质谱仪如Gao等人所述(Anal. Chem., 80: 7198-7205, 2008),Hou等人(Anal. Chem., 83:1857-1861, 2011)和Sokol等人(Int. J. Mass Spectrom., 2011, 306, 187-195),其中的内容均通过引用完整地并入本文。小型质谱仪例如Xu等人(JALA, 2010, 15, 433-439);Ouyang等人(Anal. Chem., 2009, 81, 2421-2425);Ouyang等人(Ann. Rev. Anal. Chem., 2009, 2, 187-214);Sanders等人(Euro. J. Mass Spectrom., 2009, 16, 11-20);Gao等人(Anal. Chem., 2006, 78(17), 5994-6002);Mulligan等人(Chem. Com., 2006, 1709-1711);和Fico等人(Anal. Chem. 2007 79, 8076-8082),其中的内容全部通过引用并入本文。

[0053] 非连续大气压接口

[0054] 在某些实施例中,本发明的系统配备有非连续接口,该接口对于小型质谱仪特别有用。例如,Ouyang等人(美国专利号8304718)中描述了示例性非连续接口,其内容通过引用全部并入本文。

[0055] 定量

[0056] 产品开发的主要目标是使用MS技术进行简单分析,同时保留必需的定性和定量性能。根据之前在开发原位电离和小型MS系统方面的经验,纳入内标物会对产品开发具有长期益处。A/IS比的MRM(多反应监测)测量已被证明是一种稳健而有效的方法,可为实验室规模和小规模MS系统带来高定量精度。然而,对于POC MS产品开发,需要用适用于POC程序的简单方法完全取代用于合并IS的实验室技术和程序。

[0057] 在一个实施例中,可在制造盒时在纸基材上预打印内标物(IS),以便在生物流体样本沉积时将IS混合到生物流体样本中。样本体积由毛细管体积控制。在以前的研究中,RSD优于13%;然而,IS和生物流体样本的沉积不一致可能对定量结果产生重大不利影响。喷

墨打印可用于在纸张基材上的窄带内沉积已知量的IS化合物,该基材可被待沉积的生物流体样本完全覆盖。这有望显著提高再现性。

[0058] IS涂层采样毛细管是另一种通过简单程序进行定量的方法。毛细管壁内的IS涂层是通过毛细管效应应用IS溶液填充毛细管,然后让溶液干燥而制备的。通过毛细管效应,IS也被混合到填充的样本中。该方法的一个非常显著的优点是,由于IS溶液和所涉及的生物流体样本的量始终相同,因此不需要精确控制毛细管体积以获得高度一致的定量。这代表了大规模生产的巨大简化。数据显示,对于小于1 μL 的血液和尿液样本,RSD优于5%。IS涂层的毛细管可以装在充满空气或干燥氮气的塑料袋中,并在室温和低温下储存1至20周。

[0059] 除上述两种方法外,直接提取分析物的另一种方法涉及使用段塞流微萃取(PCT/US15/13649,其内容通过引用全部并入本文),然后使用盒进行喷雾电离(图11F)。这种方法有两个潜在的优点。立即提取分析物有助于保存因湿生物流体中的反应而不稳定的分析物,如血液中的胍。此外,IS的掺入可与提取一起进行。在之前的研究中,甲基苯丙胺-d8被预先添加到萃取溶剂乙酸乙酯中,用于甲基苯丙胺尿液的定量。基于相同的分配系数,IS和分析物在两相之间重新分配;因此,为提取溶剂测量的比率可用于量化尿样中甲基苯丙胺的原始浓度。

[0060] 援引并入

[0061] 本发明还引用了其他文件,如专利、专利申请、专利出版物、期刊、书籍、论文、网络内容。出于其作用,所有此类文件均通过引用全部并入本文中。

[0062] 等同

[0063] 本领域技术人员将从本文件的全部内容(包括本文引用的科学和专利文献)中清楚地理解,除了本文所示和描述的内容外,本发明及其许多其他实施例的各种修改。本文的主题包含重要信息、示例和指南,这些信息、示例和指南可适用于本发明在其各种实施例及其等同中的实践。

[0064] 举例

[0065] 在不同的商用质谱仪和国产小型质谱仪上应用纸喷雾时,观察到一系列因素会显著影响纸喷雾质谱分析的性能。使用加热毛细管的质谱仪,如TSQ(美国加利福尼亚州圣何塞Thermo Scientific),观察到总体性能最佳。对于使用气帘气的QTrap 4000(加拿大安大略省康科德市Sciex),由于气帘气使纸上的溶剂干燥,喷雾稳定性较差,持续时间较短。商业纸喷雾盒中的基材使用了0.5 mm厚的Whatman ET 31纸(Whatman International Ltd,英国梅德斯通)。然而,当使用Mini 12质谱仪进行纸喷雾时,发现厚度为0.18 mm的Whatman 1级纸的灵敏度远远高于ET 31。基材的厚度会影响喷嘴的锋利度,因此在喷雾过程中,较厚的基材会形成较大的液滴。由于Mini 12上接口不太复杂,对于没有加热毛细管或气帘气的非连续大气压接口(DAPI),使用ET 31作为纸质喷雾基材进行MS分析时,去溶剂效率较低,灵敏度显著降低。遗憾地,薄纸基材(如1级)在湿润时变得非常柔软,因此无法在盒中使用。我们还发现,用于制造纸质基材的大规模生产工艺(如模切)在从纸张上制作尖头方面存在不一致的问题。

[0066] 在之前的研究中,我们使用萃取喷雾来提高Mini 12分析血液样本中治疗药物的灵敏度和定量精度。将带有干血点的纸条插入带有拉制尖端的nanoESI管中进行喷雾,提取分析物到管中的溶剂中,并通过拉制尖端进行喷雾电离。萃取喷雾就是一个例子,它利用了

快速样本清洁,然后用形状良好的尖端进行喷雾电离。然而,将萃取喷雾本身用于盒设计带来了分析流程的复杂性。为了解决观察到的纸喷雾问题,并为小型MS系统开发一种性能合适的一次性盒,我们开发了一种纸毛细管装置(图6A),以取代用于直接采样电离的纸基材。与原始的纸喷雾相比,对该简单装置进行了系统的表征。

[0067] 例1

[0068] 方法

[0069] 所有化学品均从Sigma Aldrich(美国密苏里州圣路易斯)购买。牛全血购自Innovative Research(美国密歇根州诺维市)。用于制造纸基材的色谱纸(1级和ET31级)从Whatman(Whatman International Ltd,英国梅德斯通)处购买。纸毛细管喷雾用熔融石英管(外径130 μm ,内径50 μm)购自莫仕公司(美国伊利诺伊州利斯勒)。使用QTrap 4000质谱仪(加利福尼亚州多伦多应用生物系统公司)和国产小型质谱仪Mini 12进行质谱分析,QTrap 4000质谱仪配备了使用气帘气的大气压接口(API),Mini 12具有非连续大气接口。

[0070] 对于纸喷雾,通过将纸张切割成底部为6 mm、高度为10 mm的三角形来制备喷雾基材。在纸喷过程中,使用鳄鱼钳固定纸张基材,并向其施加3.5 kV的直流电压。如果未指定,25 μL 和70 μL 的洗脱溶剂分别用于1级(0.18 mm厚)和ET31(0.5 mm厚)基材的纸喷雾。为了制造纸毛细管装置,使用陶瓷切割器将内径为50 μm 、外径为150 μm 的熔融石英管切割成短节。然后将毛细管插入ET31(0.5 mm厚)纸张基材中,嵌入纸张中的长度约为3 mm。

[0071] 例2

[0072] 使用本发明的探针进行样本分析

[0073] 图6A示出本发明的系统。该系统包括具有多孔材料和中空构件(例如,空心毛细管)的探针。探针通过多孔材料与电极耦合,探针产生离子,离子从中空构件释放,进入质谱仪,如小型质谱仪。本发明的纸毛细管装置可以用两种不同的方法制造。可以使用刀片将纸基材从侧面分开,以便插入毛细管(图6B);或者,可以在ET31纸张基材的中间进行切割,然后将毛细管推入并嵌入切口内(图6C)。通过这两种方法制造的设备在性能上没有显著差异。然而,后一种方法可能更适合设备的大规模生产。

[0074] 切割后的毛细管末端可能是具有锋利的微尖端的不规则形状,如显微镜拍摄的照片(图7A)所示。这些小型喷头可能会导致分叉的喷雾。使用打火机燃烧毛细管,以去除聚酰胺涂层,并使每个毛细管末端的边缘光滑(图7B),光滑的末端可被配置成临近质谱仪的入口。纸毛细管装置分别使用原始和烧过的毛细管制成,喷雾器伸出3毫米。它们用于分析含有浓度为100 ng/mL的甲基苯丙胺的牛全血样本。每次分析时,将3 μL 血样沉积在纸基材上,并干燥以形成DBS。然后使用70 μL 的甲醇:水(9:1, v:v)作为萃取/喷雾溶剂。使用QTrap 4000以[M+H]⁺ m/z 150为前体离子进行MS/MS分析。图7C示出提取了特征碎片离子m/z 91的离子流图。图7D-7E也示出平均MS/MS谱图,以进行比较。使用烧过的毛细管喷雾器可获得三倍以上信号强度。原始毛细管的粗糙边缘可能导致分叉的喷雾,从而使喷雾液流不稳定且强度较低。去除聚酰胺涂层后,毛细管的外径减小了约20 μm ,这也有助于在喷涂过程中产生较小的液滴,并最终有助于改善离子信号。

[0075] 此外,还研究了毛细管喷雾器伸出基材的影响。制作了二个纸毛细管装置,一个喷雾器长度为3mm,另一个喷雾器长度为10mm。对它们进行比较以分析纸基材上干血点中的治疗药物化合物,每个血点由3 μL 血样沉积而成。在每次分析中,将100 μL 的MeOH:H₂O(9:1, v:

v) 加在纸基材上,并使用在大气压接口处带有气帘气的QTrap 4000进行MS分析。图8A示出了使用 m/z 465→165的SRM(单离子监测)分析100 ng/mL维拉帕米时采集的离子流图,其中使用了带有10 mm喷雾器的纸毛细管装置。连续采集的离子信号呈现脉冲模式。从喷雾的第1分12秒到第6分20秒,脉冲宽度变宽。然而,当使用3毫米的喷雾器时,没有观察到这一点。图8B示出使用SRM m/z 278→233分析100 ng/mL阿米替林采集的离子流图。使用10 mm喷雾器观察到的脉冲喷雾模式表明,喷雾器尖端的溶剂消耗超过了以毛细作用穿过纸基材的量。喷雾器的延伸打破了溶剂输送的平衡,而直接纸喷雾或带有短喷雾器的纸毛细管喷雾则能维持溶剂输送。我们还使用TSQ测试了带有10毫米喷雾器的基材,TSQ有一个加热毛细管,但在入口处没有气帘气。令人惊讶的是,没有观察到脉冲模式,这支持了一个假设,即气帘气促进的更快消耗导致了不连续喷雾。

[0076] 在对基材上的喷雾器进行优化后,比较了1级(厚度0.18 mm,图9A)、ET 31(厚度0.5 mm,图9B)和带有3 mm烧过的喷雾器的纸毛细管装置(图9C)的电离效率。将含有治疗药物的喷雾溶剂MeOH:H₂O(9:1, v:v)沉积在基材上,并施加高压以产生喷雾电离。对于1级纸喷雾基材,每次分析使用的溶剂量为25 μ L,但对于ET 31纸喷雾基材和纸毛细管装置,使用的溶剂量为70 μ L,后者也使用较厚的ET31纸张作为基材。使用QTrap 4000进行第一次比较,以分析在50 ng/mL的喷雾溶剂中加入的伊马替尼。使用前体离子 m/z 494进行的MS/MS分析显示,1级纸张喷雾基材(图9D中d)和纸毛细管装置(图9D中f)的碎片峰强度相似,但ET31纸喷雾基材的强度要低50倍(图9D中e)。使用Mini 12分析20 ng/mL的阿米替林时也观察到类似现象(图9E)。对于图9D中d和图9E中g,1级纸喷是基材。对于图9D中e和图9E中h,ET31喷纸是基材。对于图9D中f和图9E中i,使用了纸毛细管装置(3mm喷雾器)。使用ET 31获得的纸喷雾的强度远低于使用1级纸喷雾或纸毛细管喷雾获得的强度。厚纸基材与毛细管喷雾器的结合代表了盒设计的良好策略。使用ET 31作为纸基材可负载相较于使用比较薄基材(如1级)更多的样本。然而,与纸张厚度相关的低电离效率现在可以通过毛细管喷雾器解决。在纸毛细管喷雾的系统表征过程中,无论平均强度如何提高,分析物离子的监测信号强度在不同的扫描中都有显著的波动。结果表明,样本沉积方法对分析物信号的稳定性产生了意想不到的影响。如图10A所示,血样最初沉积在纸基材的中心,形成DBS,正如纸张喷雾一样。然而,每次扫描的信号波动比纸喷大得多。图10A中示出使用QTrap 4000对牛全血中100 ng/mL阿米替林进行SRM分析时记录的离子计时图。将100 μ L的MeOH:H₂O(9:1, v:v)置于纸基材上,用于分析物提取和喷雾电离。监测碎裂离子对 m/z 278→233。相反,当样本以边到边的带状形式沉积时,分析物信号的稳定性显著提高(图10B)。将萃取溶剂施加在三角形纸张基材的底部,并在毛细作用下趋向尖端;因此,如果血液样本以边到边的带状方式沉积,所有溶剂都将穿过血液样本。这将提高到达毛细管喷雾器的喷雾溶剂中分析物浓度的一致性。

[0077] 随着喷雾稳定性的提高,使用Mini 12对纸毛细管喷雾的定量性能进行评估,以分析血液中的西他列汀(JANUVIA)。制备牛全血中西他列汀浓度为10、50、100、500、1000和2000 ng/mL的样本,以建立校准曲线。每个DBS使用3 μ L的血样在基材上制备,并使用75 μ L MeOH:H₂O(9:1, v:v)作为每次分析的萃取和喷雾溶剂。以质子化离子 m/z 408为前体进行MS/MS分析,并绘制碎片离子 m/z 235的离子强度作为浓度的函数,以建立校准曲线,如图10B所示。线性范围很好地覆盖了西他列汀(16-200 ng/mL)的治疗窗口,实现RSD优于25%。

[0078] 在POC程序中应用MS分析的最终解决方案取决于直接采样设备和小型系统的组合。开发适用于原位电离的一次性样本盒是使用简单方案进行MS分析的一个有希望的方向。纸毛细管喷雾继承了纸喷雾的特点,用于简单采样和快速分析物提取,但也利用了与传统的nanoESI一样的喷雾玻璃喷雾器的高电离效率和再现性的优势。这项研究为将来设计使用带有大气压接口的小型MS系统分析生物流体样本的一次性样本盒提供了一个有希望的解决方案。

[0079] 例3

[0080] 使用本发明的探针分析化合物

[0081] 请参考图3,其中显示了使用类似于图1B中的设备和TSQ质谱仪(加利福尼亚州圣何塞市Thermo Scientific)对牛血中50 ng/mL可卡因的分析。使用厚度为0.4mm的Whatman 31ET纸将基材制成梯形。将8mm熔融石英毛细管(内径49 μ m,外径150 μ m)插入基材约3mm的深度。将5 μ L血样加到纸基材上,形成干血点。在基材上加30 μ L的甲醇,用于分析物提取和喷雾电离。用3000 V电压诱导喷雾。a)用SRM采集m/z 304到182的提取离子流图。b)前体m/z 304的MS/MS谱。

[0082] 请参考图4,图4显示了使用类似于图1A和Mini 12质谱仪的装置分析甲醇溶液中的可卡因(10 ng/mL)和维拉帕米(30 ng/mL)。使用厚度为0.4mm的Whatman 31ET纸将基材制成梯形。将8mm熔融石英毛细管(内径49 μ m,外径150 μ m)插入基材约2mm的深度。将15 μ L样本加到纸基材上。用3000 V电压诱导喷雾。采用双槽SWIFT波形分离前体离子m/z 304和m/z 455;双频交流信号用于激发CID的两个前体。采集MS/MS谱图。

[0083] 请参考图5,图5显示了使用类似于图1B和Mini 12质谱仪的设备对牛血中50 ng/mL可卡因的分析。使用厚度为0.4mm的Whatman 31ET纸将基材制成梯形。将8mm熔融石英毛细管(内径49 μ m,外径150 μ m)插入基材中约2mm的深度。将5 μ L血样加到纸基材上,形成干血点。在基材上加30 μ L的甲醇,用于分析物提取和喷雾电离。用3000 V电压诱导喷雾。图中显示前体m/z 304的MS/MS谱图。

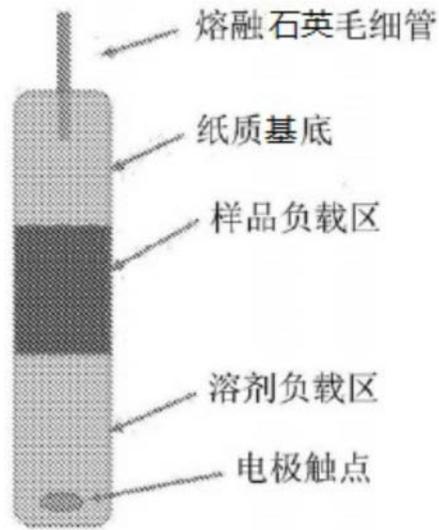


图1A

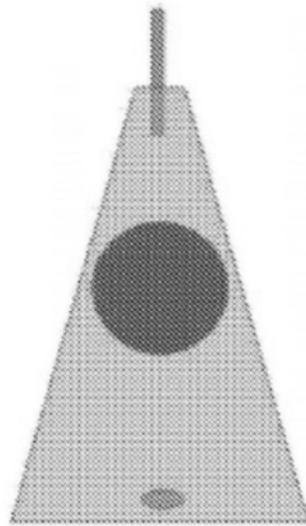


图1B

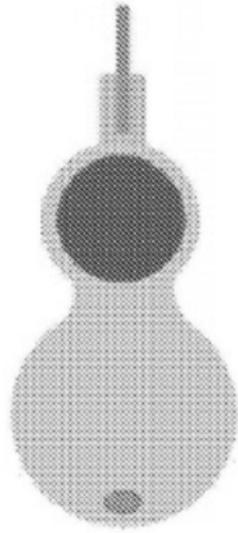


图1C



图1D

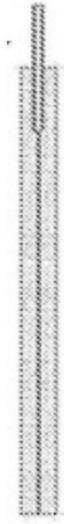


图1E

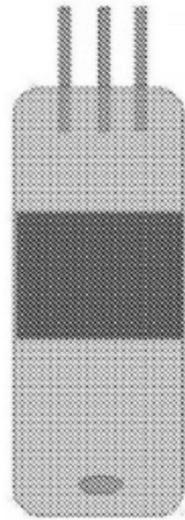


图2A

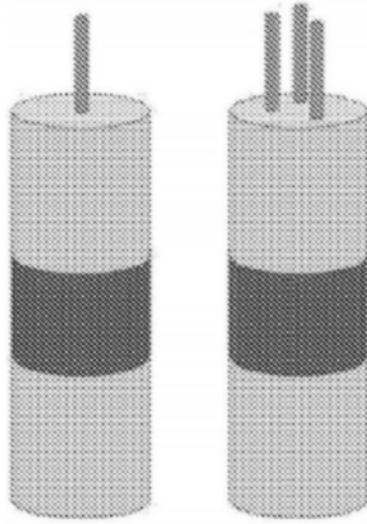


图2B



图2C



图2D

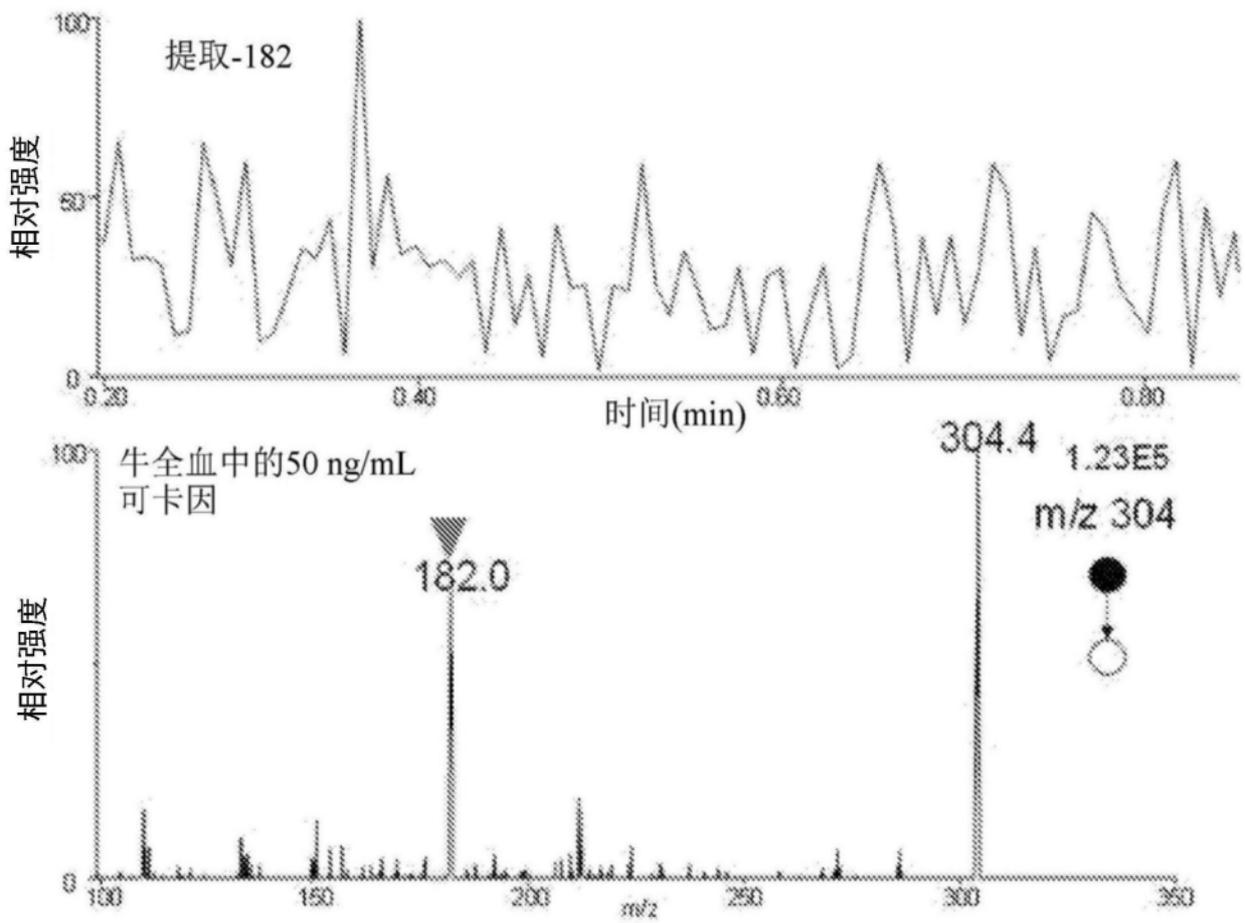


图3

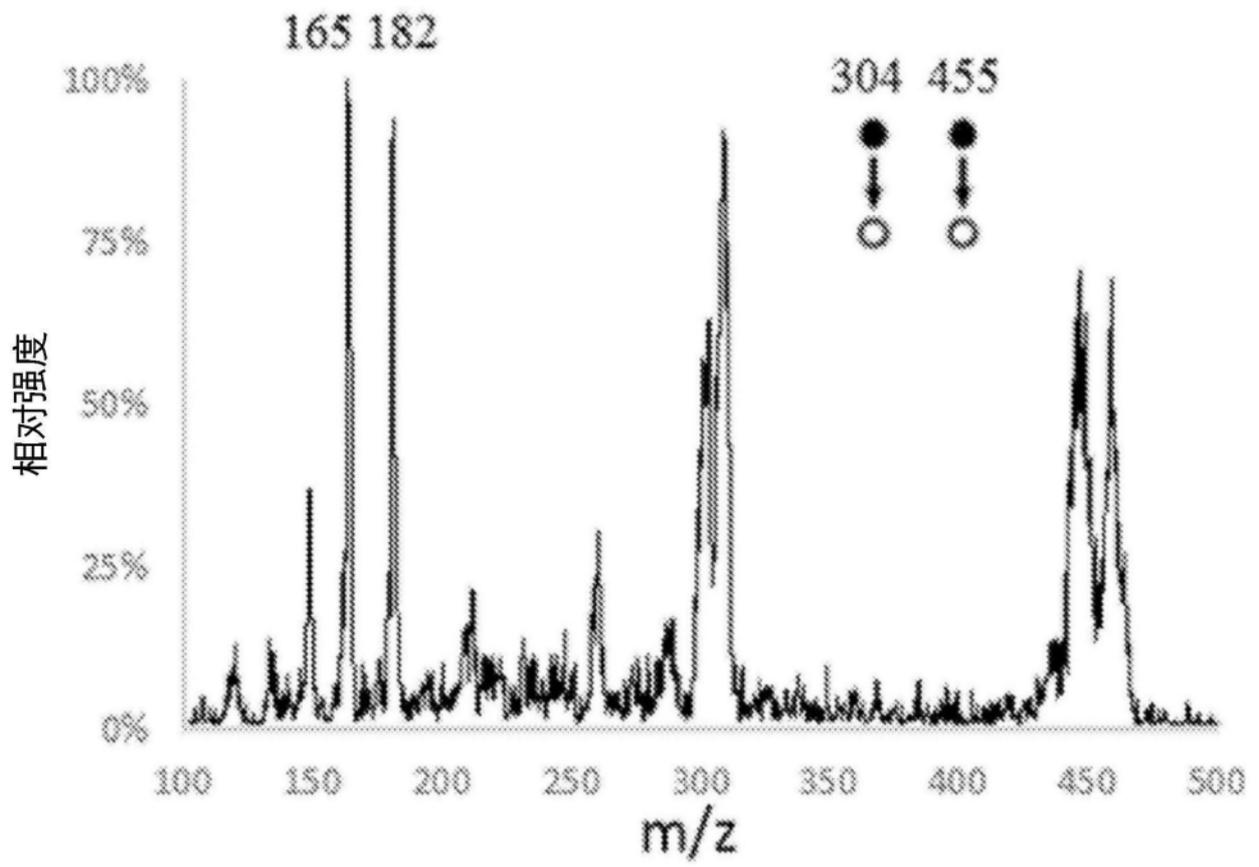


图4

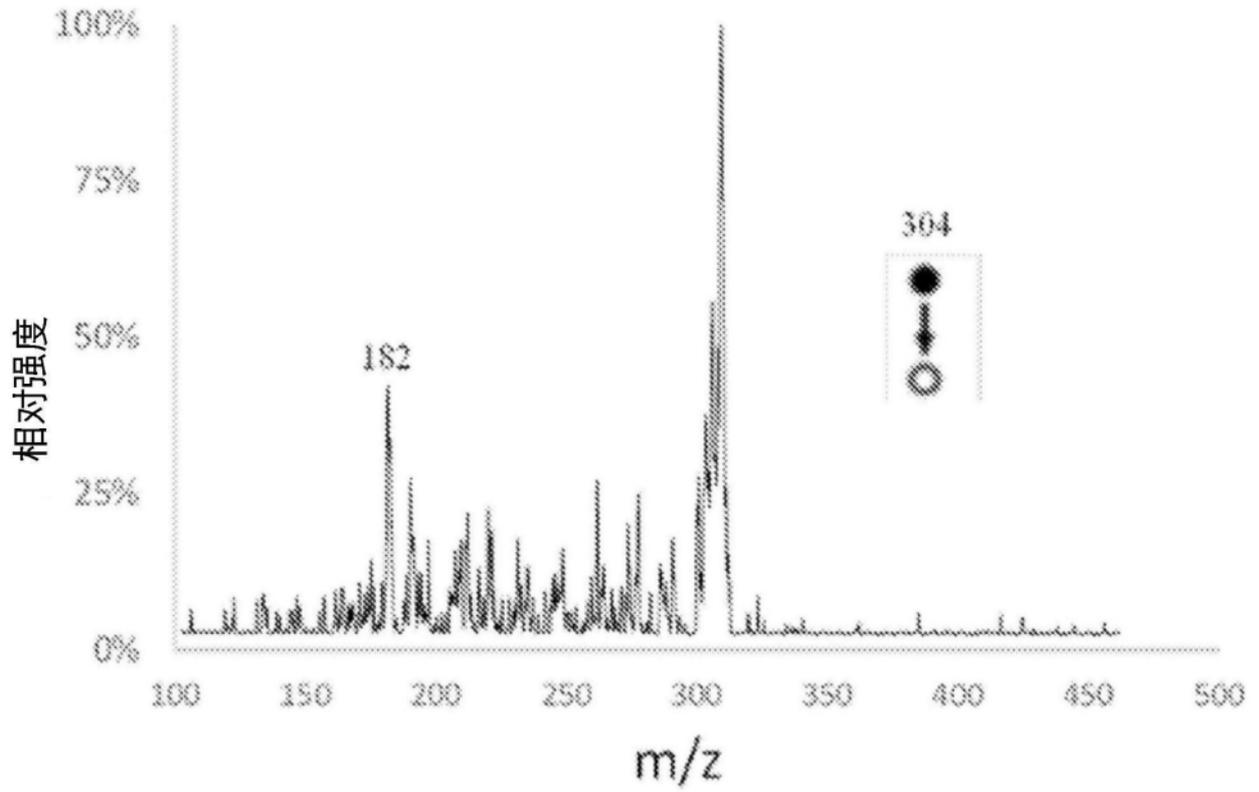


图5

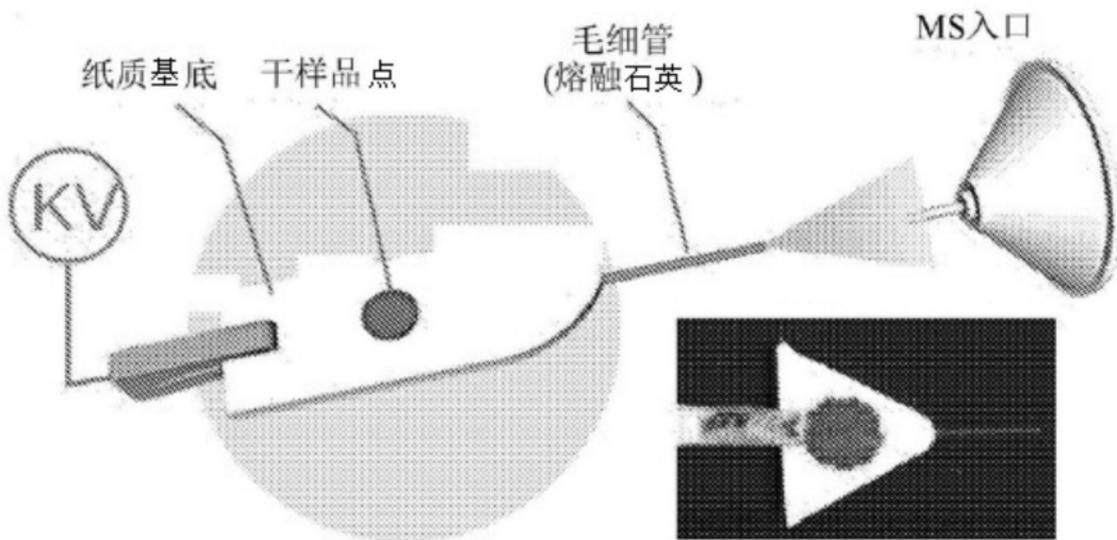


图6A

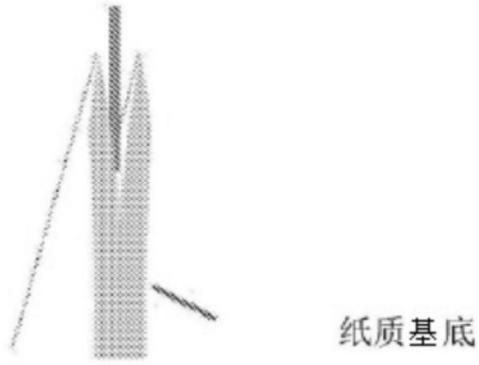


图6B

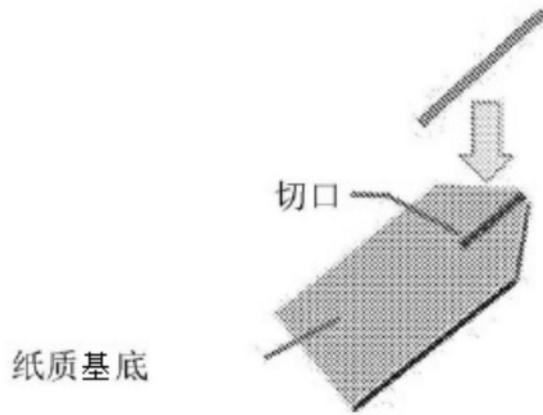


图6C

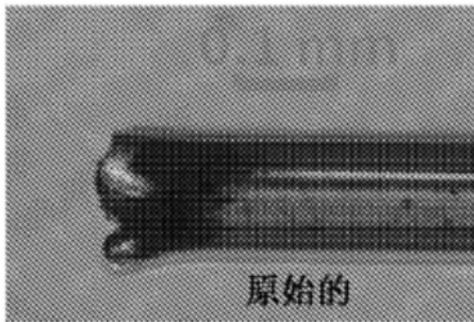


图7A



烧过的

图7B

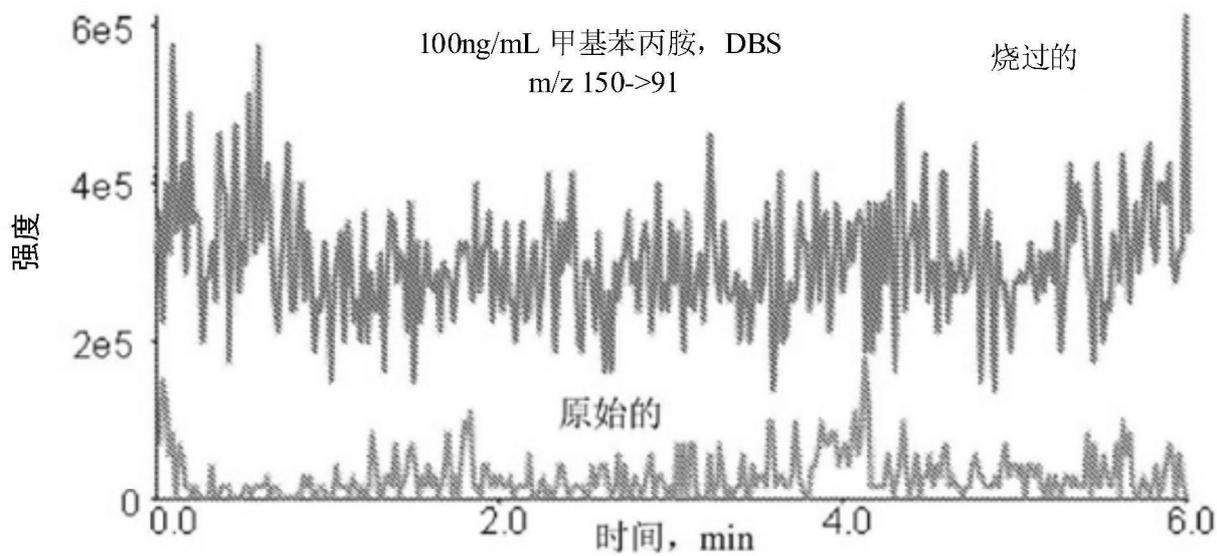


图7C

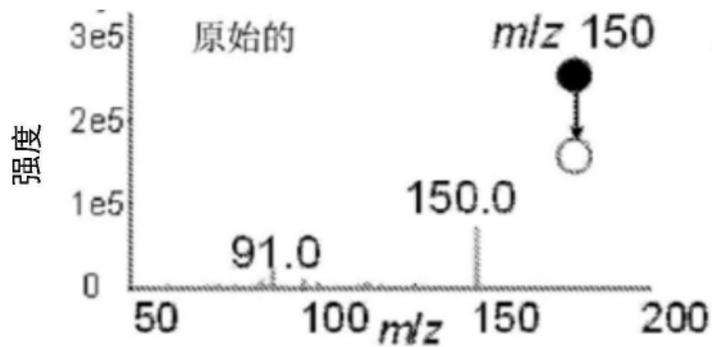


图7D

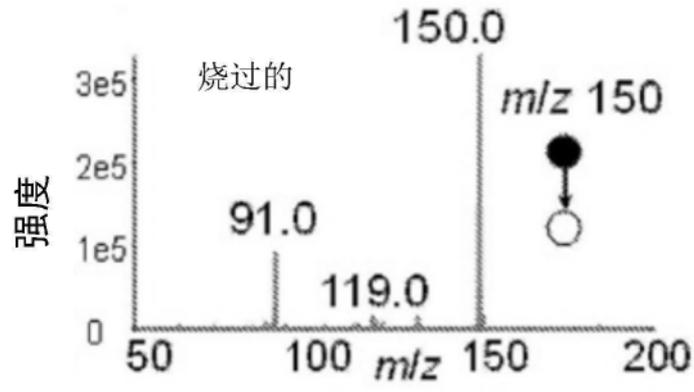


图7E

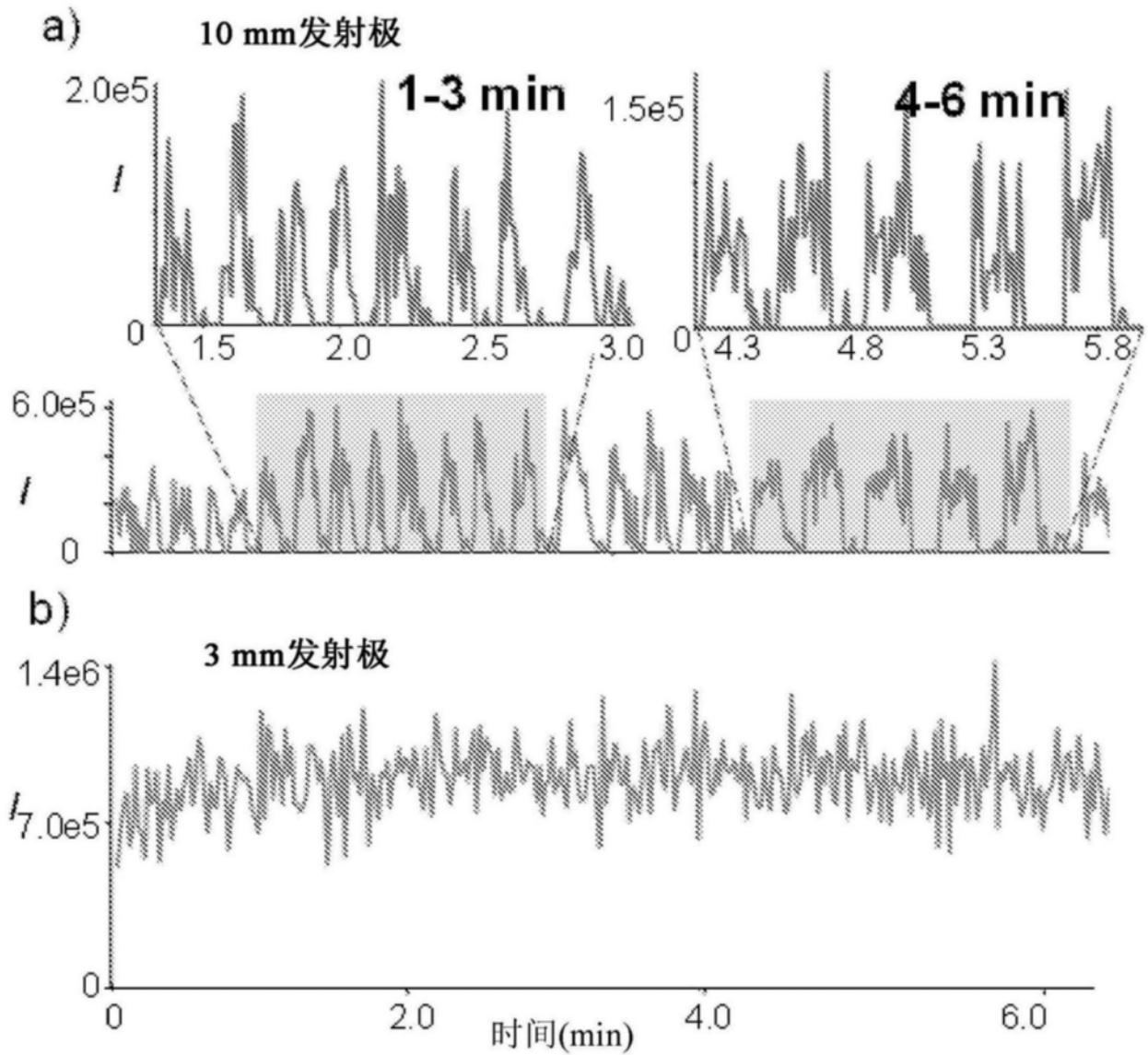


图8

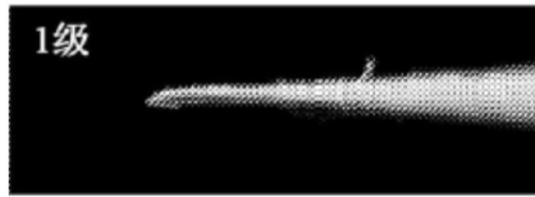


图9A



图9B



图9C

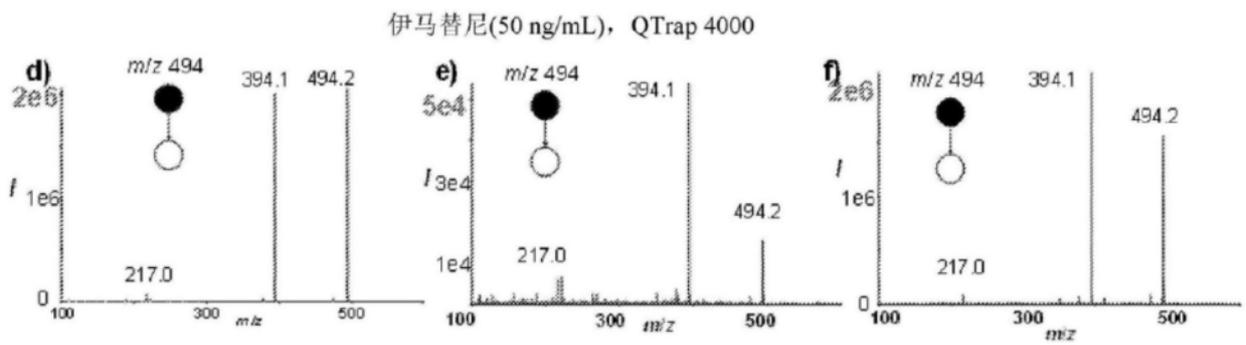


图9D

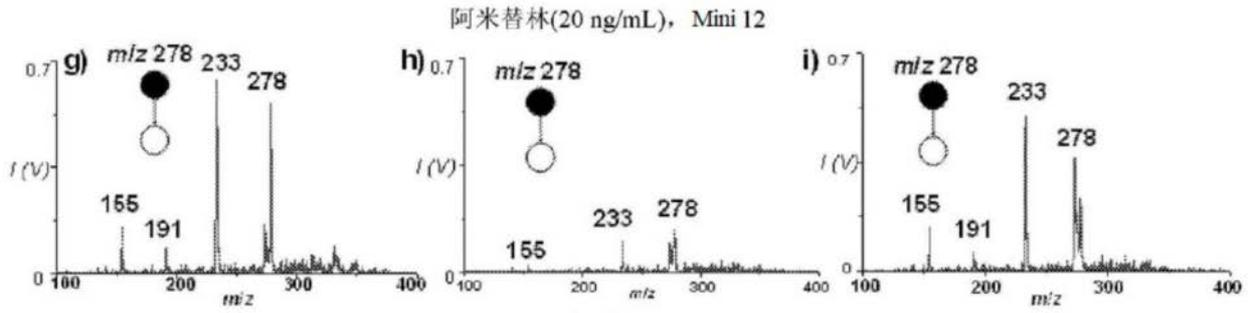


图9E

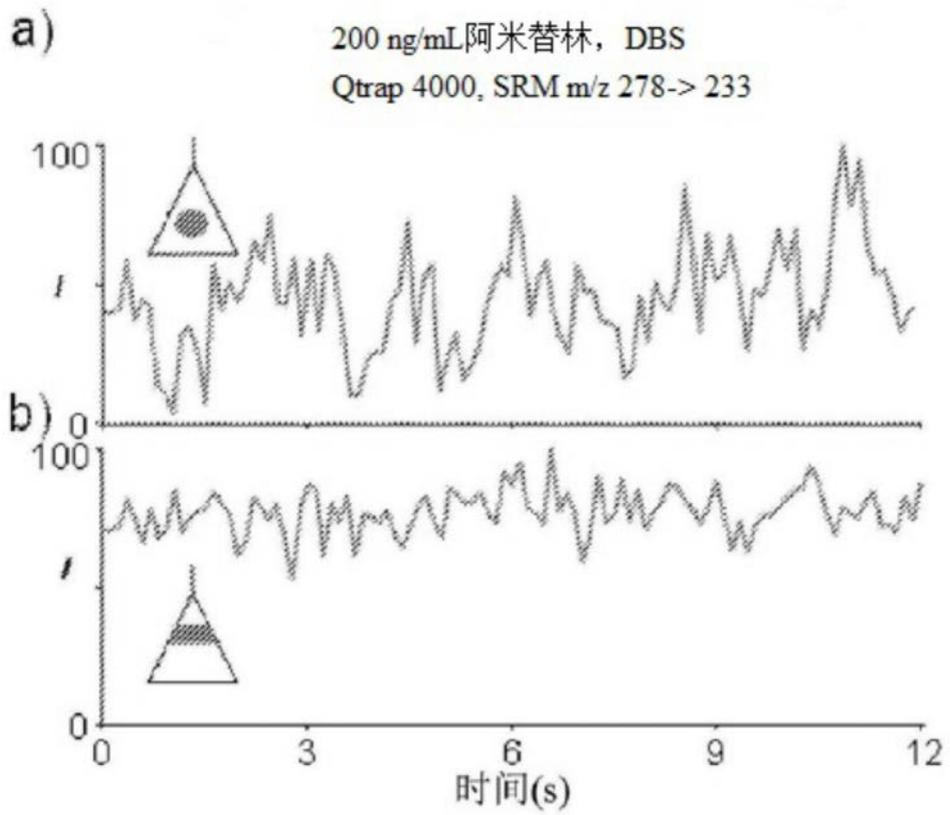


图10A

10-2000 ng/ml西他列汀, DBS, Mini 12

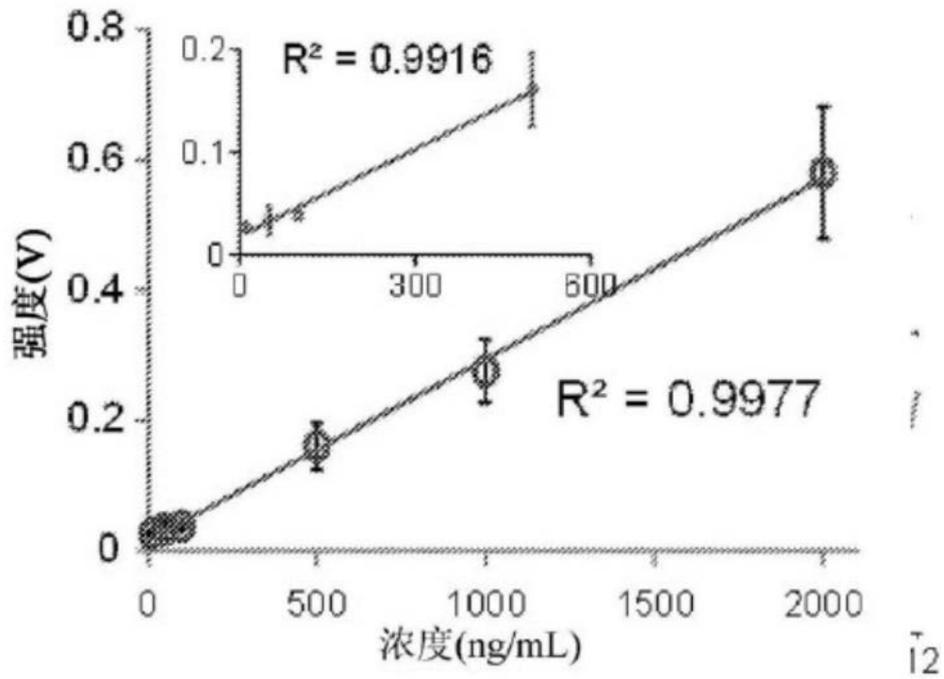


图10B



图11A

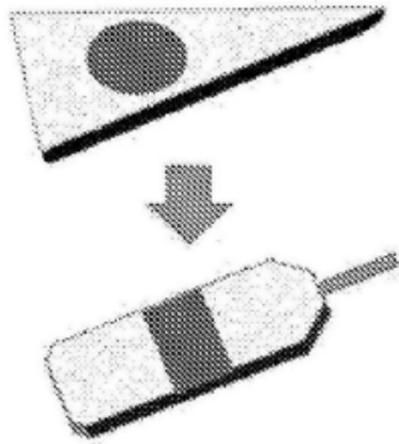


图11B

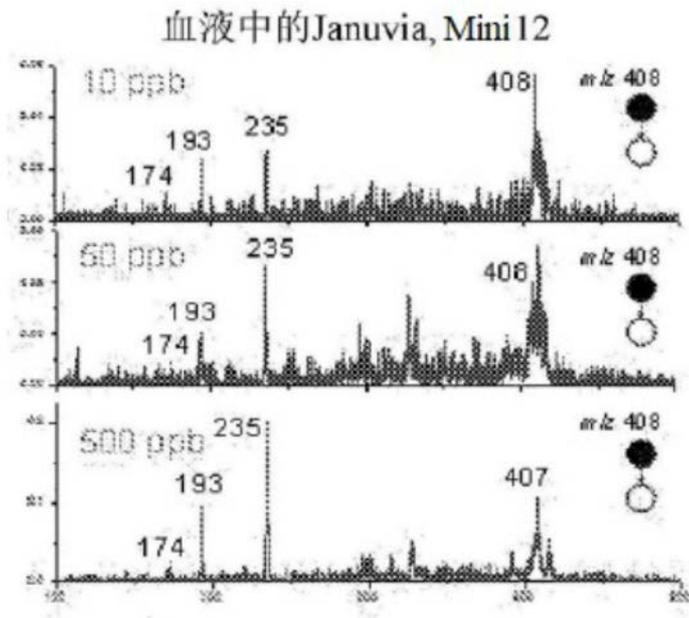


图11C

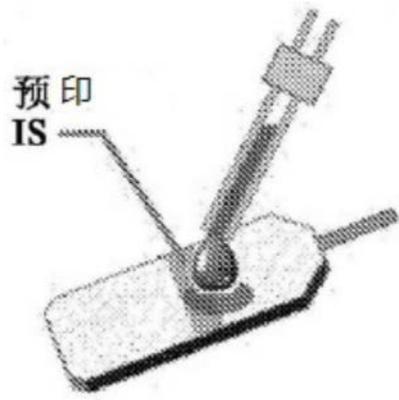


图11D

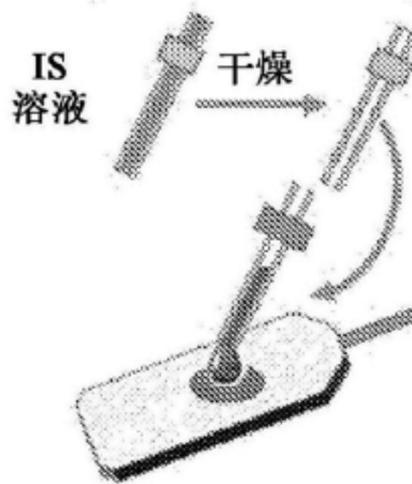


图11E

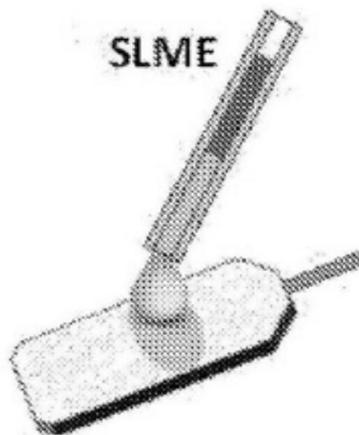


图11F