



法医学应用中的混合模式固相萃取方法开发

应用简报

法医学与毒理学

作者

Mike Chang
安捷伦科技有限公司

摘要

混合模式固相萃取用途广泛并具有强大功能，可从生物基质中提取目标化合物，是法医实验室中使用最为广泛的一种样品前处理方法。本文对 LC/MS/MS 或 GC/MS 前的样品前处理方法开发进行了总体概述，采用安捷伦 Bond Elut Certify 混合模式固相萃取缩短方法开发过程或改进现有方法。

前言

许多工作场所的滥用药物筛查都能够依靠质谱与气相色谱或液相色谱的联用系统来完成。有时为了降低检测限、提高较低或较高浓度范围的线性、扩展校正曲线范围，或者当样品量有限或分析柱更换过于频繁时，法医实验室的科学家需要对现有标准操作规程 (SOP) 进行修改。在考虑新的固相萃取 (SPE) 方法开发时，没有捷径建立新的方法。在对尿中苯环利定 (PCP) 的研究中，我们评估了整个固相萃取工作流程，重点在于最终方法的决策过程。



Agilent Technologies

材料与方法

乙腈、甲醇和甲酸均为 LC/MS 级。二氯甲烷为 LC 级。乙酸乙酯为 GC 农残分析级，己烷、 NH_4OH 和 KH_2PO_4 为试剂级。水为 LC/MS 分析级，或经过 Milli-Q 过滤。醋酸为特级。PCP 和 PCP-D5 分析物购自 Sigma-Aldrich 公司。QC 样品是 Bio-Rad 实验室提供的 C2 级 Liquichek 尿毒对照品。PCP 浓度为 19 ng/mL。

样品前处理采用安捷伦 Bond Elut Certify, 130 mg, 3 mL, 50/包 (部件号 12102051)。

仪器条件

LC/MS/MS 和 GC/MS 关于脉冲不分流与脉冲分流进样的仪器参数将在其他文献中进行详细讨论 [1]。

固相萃取的原理

固相萃取吸附剂品种多样，包括反相、阳离子交换、阴离子交换和混合模式。SPE 的原理如下：先将含有目标化合物或干扰物（或二者皆有）的样品与固相吸附剂（通常为填充在小柱或多孔板中化学改性的硅胶或聚合物材料）结合，然后冲洗掉干扰物，最后洗脱并收集目标化合物。选择性地进行所有这些步骤，从而成功地将干扰物和目标化合物与样品基质分离开来。

SPE 方法开发的第一步是了解目标化合物的特性。PCP 为碱性较强的疏水化合物， $\text{pKa} = 8.29$ ， $\log P = 4.69$ 。理想情况下，阳离子交换相互作用和疏水相互作用是固相萃取的最佳选择。安捷伦 Bond Elut Certify 混合模式固相萃取能够有效地平衡疏水和阳离子交换特性，非常适用于 PCP 的分析。

常规的固相萃取工作流程包括活化、平衡、上样、淋洗、洗脱、蒸发和复溶，如图 1 所示。为了缩短时间，可省略部分步骤。

在这一步骤中，目标化合物被固相萃取吸附剂保留直至洗脱步骤，而其他干扰物则在淋洗步骤中被去除。

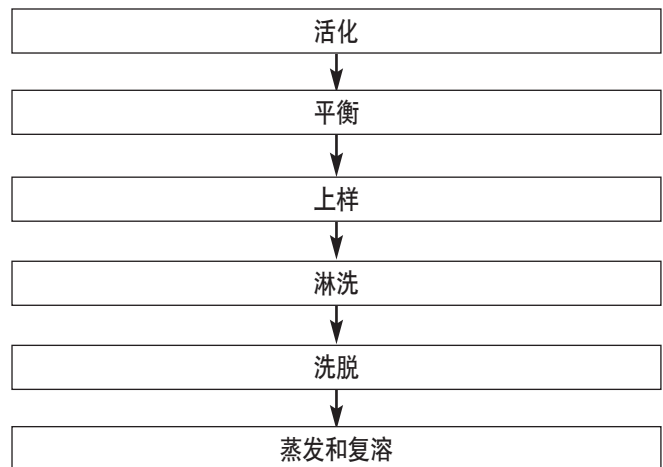


图 1. 固相萃取工作流程

从图 2 中可以看出，在优化固相萃取性能方面，前三步（活化、平衡和上样）通常不需要作太多的改变。有时，对于某些聚合物固相萃取吸附剂来说，活化和平衡步骤可以省略。最有效的优化可以在淋洗和洗脱步骤中进行。上样时，目标化合物与干扰物一起结合在吸附填料上。淋洗的目的就是去除这些干扰物。接下来，利用洗脱步骤中断目标化合物和固相萃取吸附剂之间的相互作用，回收目标化合物。固相萃取方法开发成功的关键是最大限度去除干扰物，同时保持目标化合物的最佳回收率。为了验证方法是否优化，从上样到洗脱的每一步都需要收集并进行色谱分析。

结果与讨论

活化 (2 mL MeOH) 与平衡 (100 mM KH_2PO_4 , 2 mL) 后，使用移液器吸取已加标的尿样 (1 mL)，如图 2 所示，上样过程中，将洗脱液收集在样品瓶中。用三份 1 mL 溶液进行淋洗。分别是 1 mL 5% 醋酸与两次 1 mL MeOH。将洗脱液分别收集到样品瓶中。以同样的方式进行洗脱，如 3 x 1 mL 用量，ACN + 2% NH_4OH 。然后将洗脱液分别收集到样品瓶中。图 3 中的 2 号淋洗样品瓶显示，在淋洗步骤中大多数干扰物已被 MeOH 去除。将收集到的所有洗脱液进样到 LC/MS/MS 进行分析，得到的色谱图见图 4。

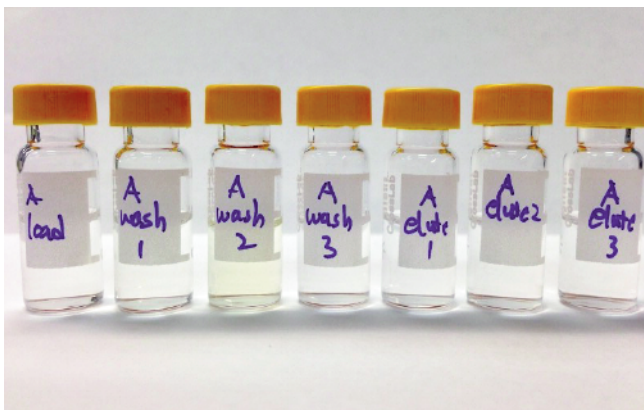


图 3. 从固相萃取方法每一步中收集到的洗脱液（从左至右分别为上样、淋洗 1、淋洗 2、淋洗 3、洗脱 1、洗脱 2 和洗脱 3 中所收集到的洗脱液）

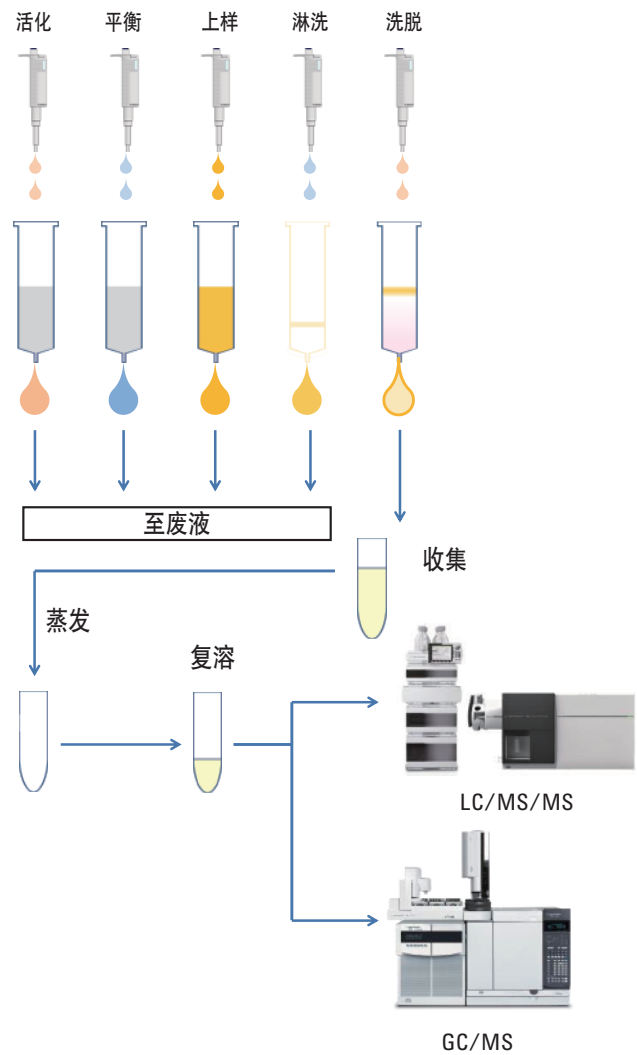


图 2. 采用固相萃取进行法医学样品分析的示意图

从图4中可以看出，在上样步骤中目标化合物PCP (RT = 1.35 min) 显然没有从吸附剂中流出。第1次到第3次淋洗所得的色谱图也表明，在淋洗步骤中PCP没有被淋洗下来。如1到3号洗脱液分析所得的色谱图所示，目标化合物PCP在洗脱步骤中从吸附剂上被洗脱下来。3号淋洗样品瓶清晰可见，且目标化合物峰并未出

现在第3次淋洗所得的色谱图上，因此3次淋洗可以忽略。3号洗脱液中的PCP数量不多，说明一份2 mL 乙腈 + 2% NH₄OH 与2号洗脱液和3号洗脱液结合，只需一个洗脱步骤即可将PCP全部洗脱下来。

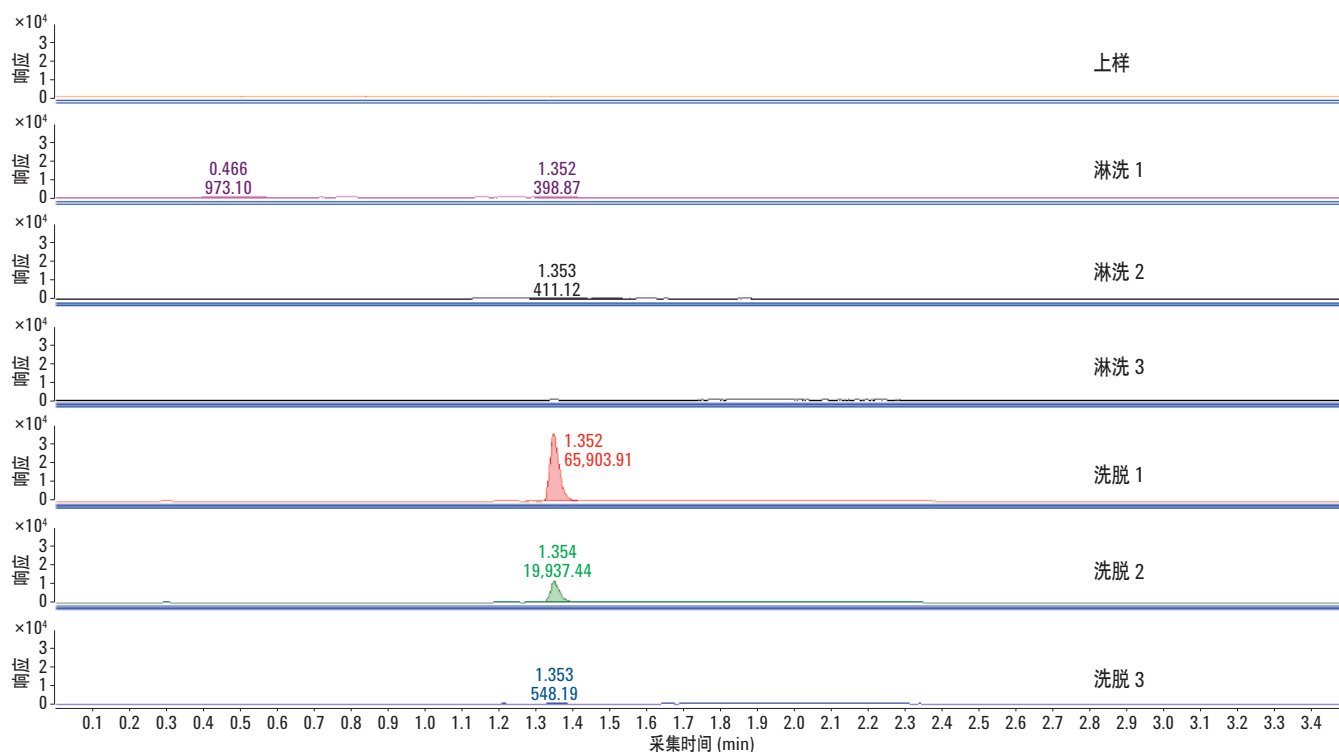
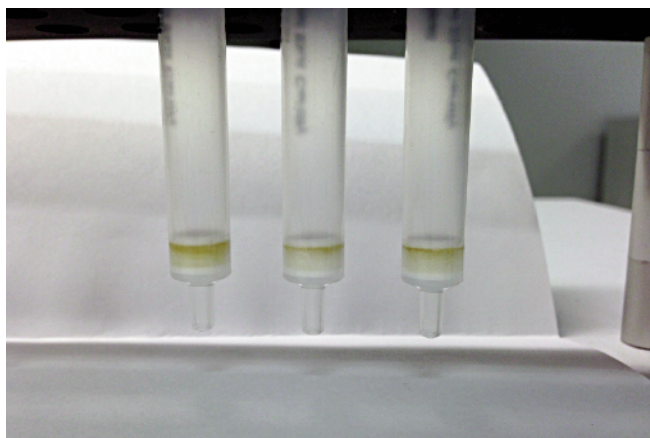
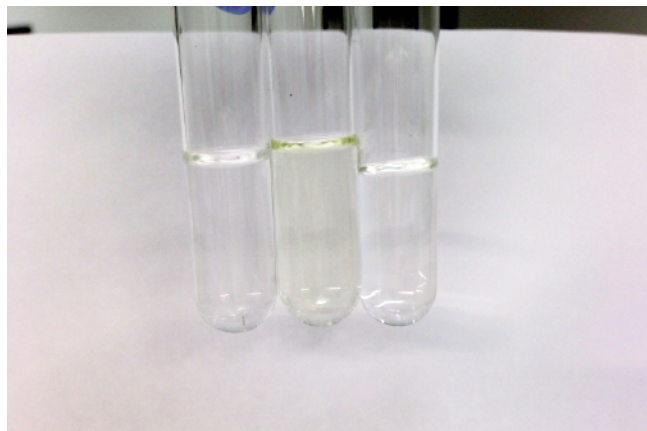


图 4. 固相萃取过程中收集到的所有洗脱液中的 PCP LC/MS/MS 色谱图

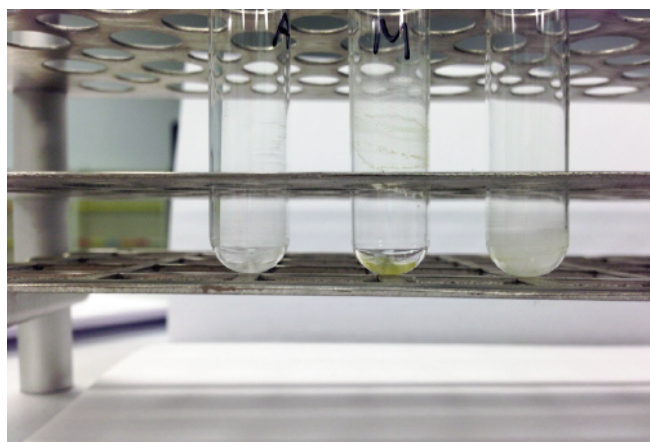
要进一步优化洗脱步骤，可以测试不同的洗脱溶剂。法医学应用中广泛采用的洗脱溶剂混合物为 DCM:IPA:NH₄OH (78:20:2)。此外，LC/MS/MS 应用中的常用洗脱溶剂为乙腈或甲醇。采用三种不同洗脱溶剂进行测试时，得到了不同的峰面积和全扫描背景信息。除了色谱图外，目视观察也很重要，图 5 显示了不同洗脱溶剂的效果。



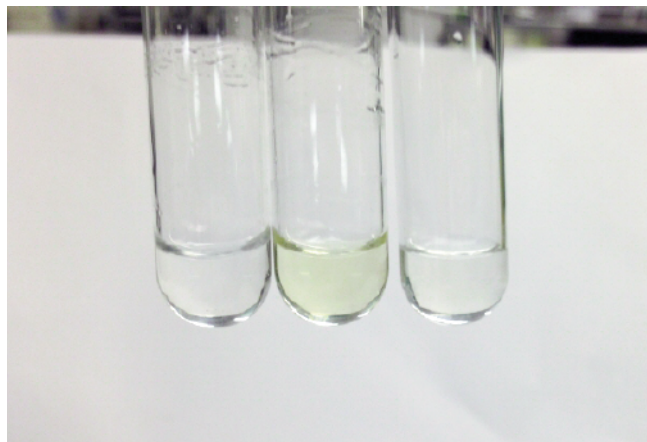
A) 洗脱后的安捷伦 Bond Elut Certify 小柱



B) 用三种不同溶剂洗脱



C) 蒸发后



D) 用初始流动相复溶

图 5. 洗脱溶剂改变实验 (从左至右分别为使用 ACN + 2% NH₄OH、MeOH + 2% NH₄OH 和 DCM:IPA:NH₄OH (78:20:2) 所得的洗脱液)

使用 MeOH + 2% NH₄OH 洗脱得到的洗脱液较脏，而用 ACN + 2% NH₄OH 和 DCM:IPA:NH₄OH (78:20:2) 则得到了清晰可视的提取物。色谱支持数据也表明以 MeOH 为主的洗脱液效果不理想，回收率较低（图 6），而且 LC/MS 背景噪音较大（图 7）。

根据图 5 到 8 显示的数据，以乙腈为主的洗脱液效果最好，最大限度减少了干扰物，使目标化合物的峰面积值达到最大。

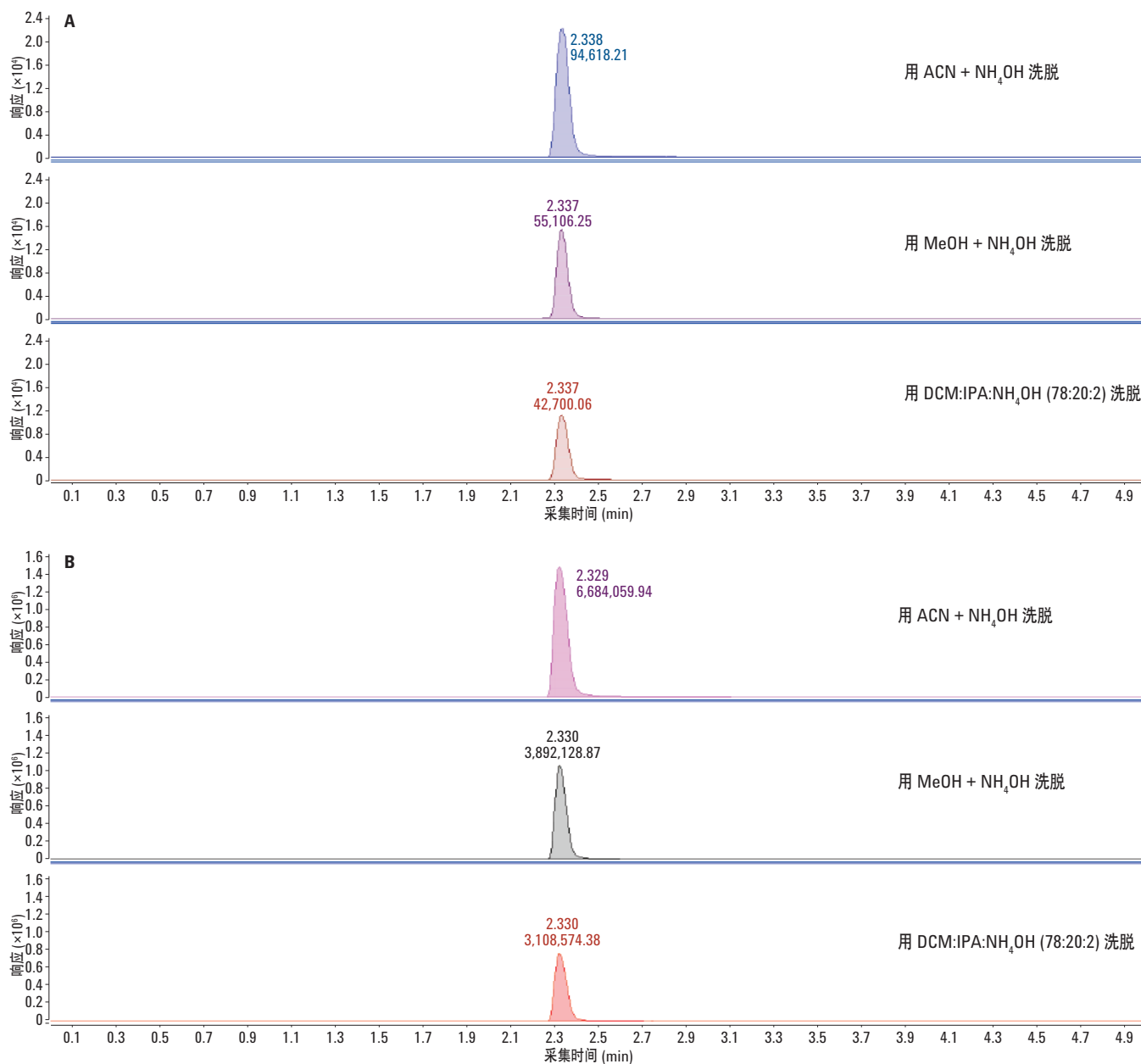


图 6. 用三种不同洗脱溶剂洗脱 PCP (A) 和 PCP-d5 (B) 所得的 LC/MS/MS PCP 色谱图 (至上而下: ACN + 2% NH₄OH、DCM:IPA:NH₄OH (78:20:2) 和 MeOH + 2% NH₄OH)

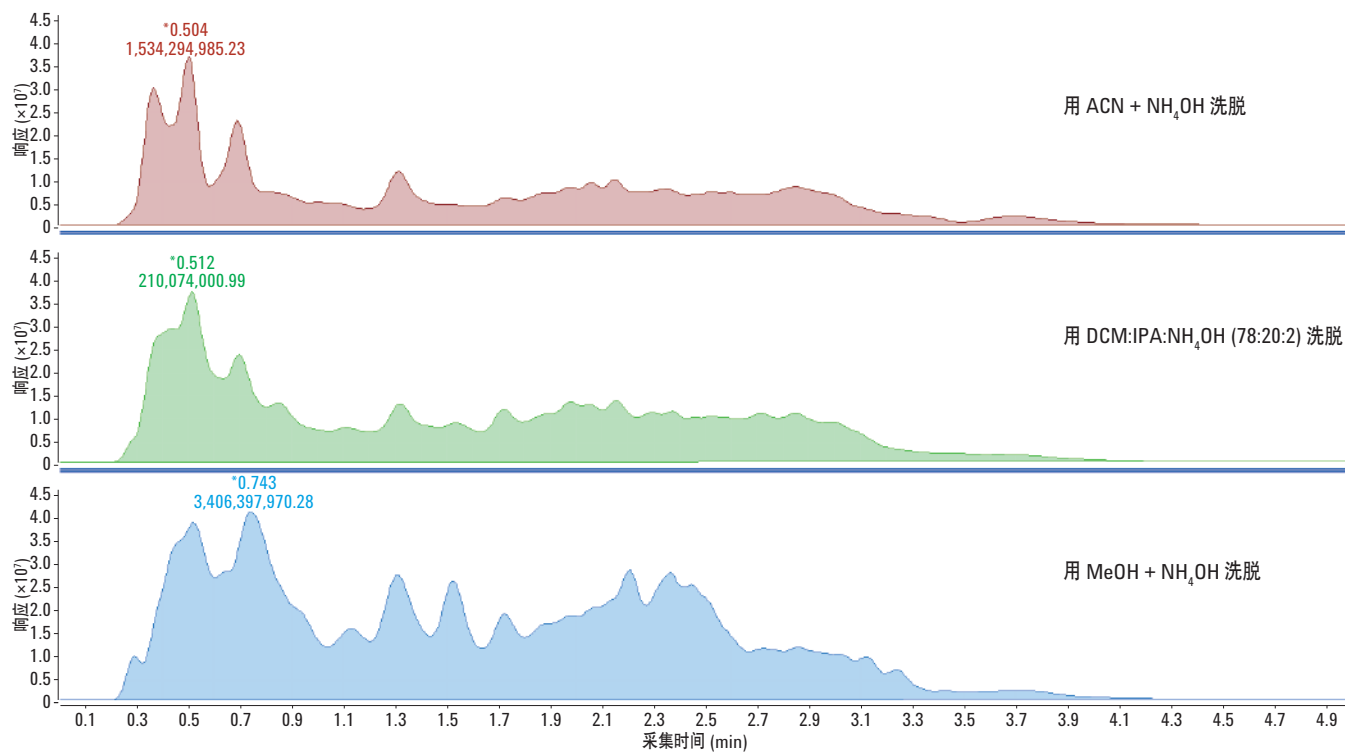


图 7. 用安捷伦 Bond Elut Certify 和不同洗脱溶剂制备的空白尿样得到的全扫描 LC/MS/MS 色谱图

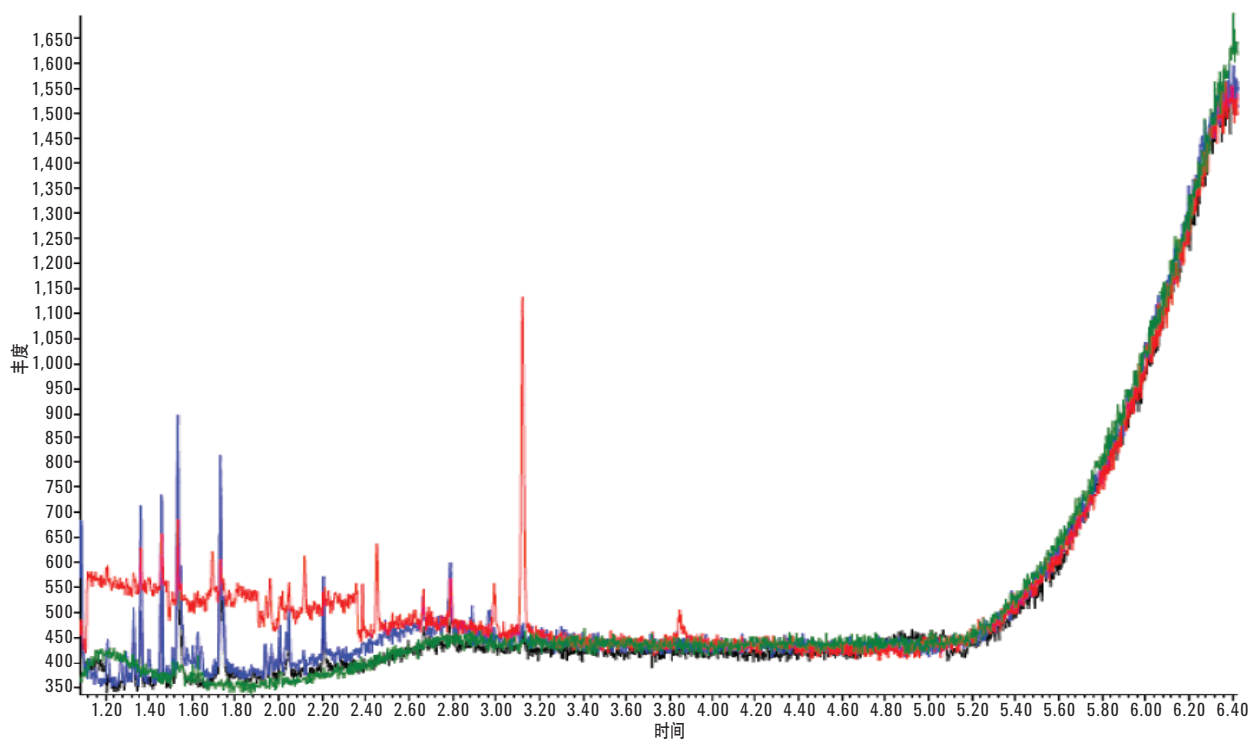


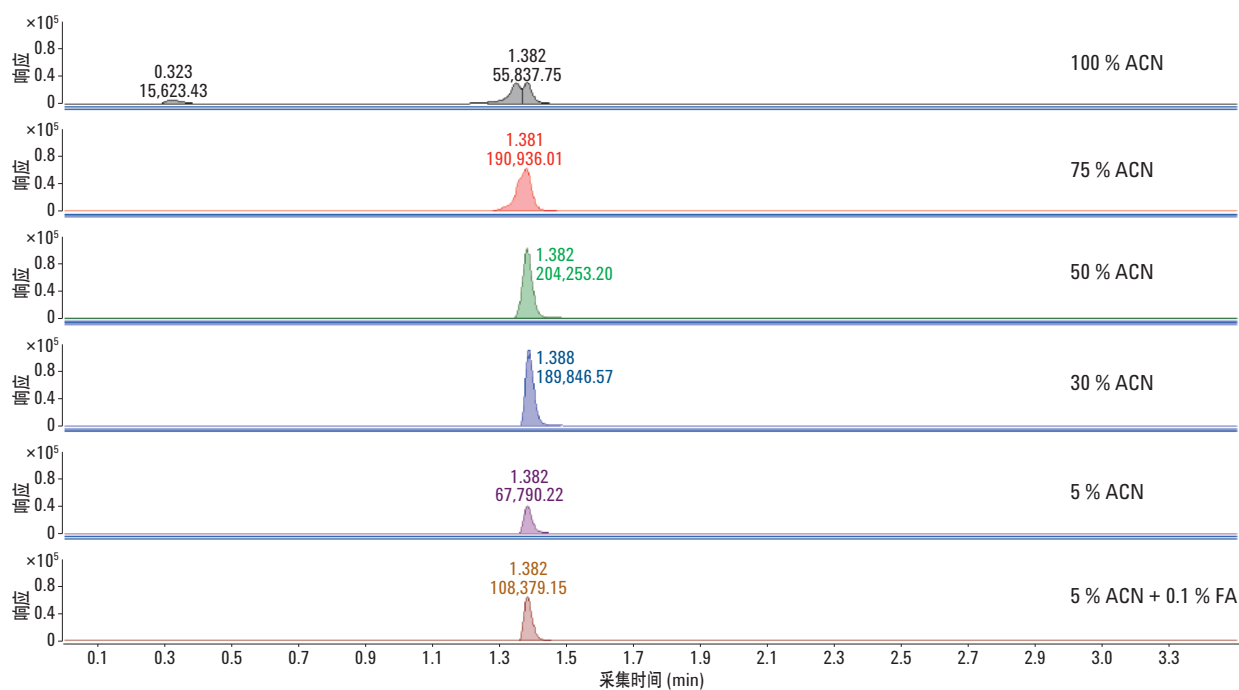
图 8. 用安捷伦 Bond Elut Certify 和不同洗脱溶剂制备的空白尿样得到的全扫描 GC/MS 色谱图

LC/MS/MS 的进样体积为亚 μL 到 $20 \mu\text{L}$ 。而对于 UHPLC 系统，进样体积往往更小。但是，如果需要大体积进样以获得更好的检测限，则可以对样品溶剂和进样体积进行研究。一般情况下，采用初始流动相作为样品溶剂。通常，样品溶剂中有机溶剂组分比例越高，离子源中的脱溶得到改善，LC/MS/MS 响应也就越高。我们还测试不同进样体积和样品溶剂组成，如图 9 所示。

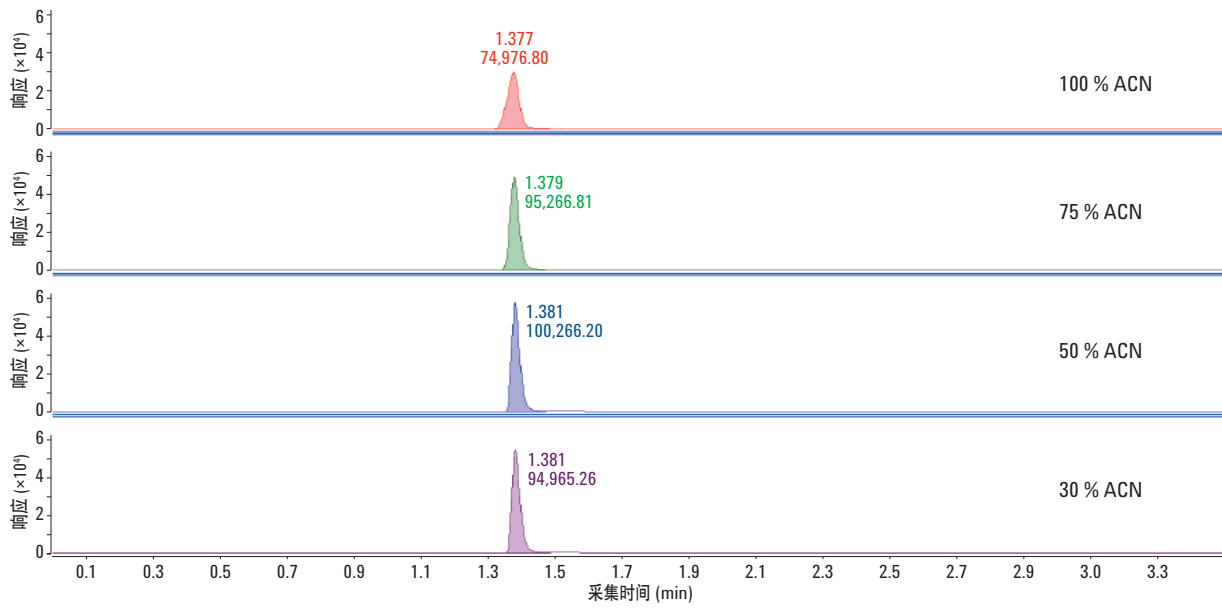
图 9 表明，当进样体积较小（如 $2 \mu\text{L}$ ）时，有机溶剂百分比对峰形和峰面积的影响极小。当进样体积较大（如 5 到 $10 \mu\text{L}$ ）时，接近初始流动相的样品溶剂组成可以改善峰形，有时也可以提高峰面积值。不同的 LC/MS/MS 条件和目标化合物，这些实验数据可能有所不同。

我们已发表了最终实验条件和人尿样的分析结果，包括样品前处理和仪器参数 [1]。

10 μL 进样



5 μ L 进样



2 μ L 进样

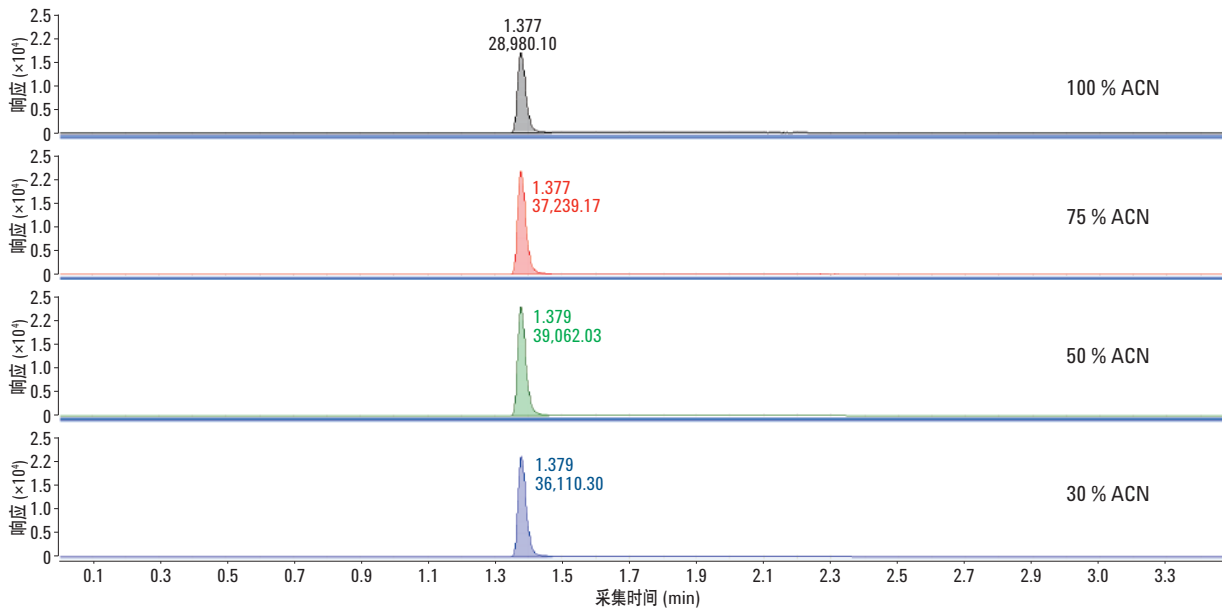


图 9. 进样体积和样品溶剂对 LC/MS/MS 的影响 (进样体积标于上方, 样品溶剂组成如每张色谱图所示)

结论

通过实际样品和色谱数据展示了使用混合模式固相萃取的样品前处理过程，得到了提高法医学应用数据质量的最佳条件。成功的固相萃取方法开发，除了需要在干扰物去除和目标化合物保留之间实现良好平衡外，还需要优化洗脱过程，以获得更纯净的萃取物。

参考文献

1. Mike Chang. *Analysis of Phencyclidine in Urine to U.S. SAMHSA Guidelines with LC/MS/MS and GC/MS*. 应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5991-2735CHCN (2014)

更多信息

有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站

www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014
2014年5月29日，中国印刷
5991-4695CHCN



Agilent Technologies