

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 和 LC-MS/MS 对全血中的 THC 和代谢物进行高效定量分析

作者

Joan Stevens 和 Limian Zhao
安捷伦科技有限公司

摘要

复杂生物样品的高效提取、净化和分析对法医学实验室极为有益。磷脂 (PPL) 已被确定为在全血中四氢大麻酚 (THC) 及其代谢物的 LC-MS/MS 分析中引起基质效应的主要来源。本应用简报介绍了全血中的 Δ^9 -THC (THC) 及其主要代谢物 11-羟基- Δ^9 -THC (THC-OH) 和 11-nor-9-羧基- Δ^9 -THC (THC-COOH) 的提取和 LC-MS/MS 分析。样品前处理中采用孔内蛋白质沉淀法 (PPT) 和 Agilent Captiva EMR-Lipid 直通 1 mL 过滤柱去除 PPL。Captiva EMR-Lipid 能够得到更洁净的洗脱液，去除全血基质中 97% 以上不需要的 PPL，且目标分析物的回收率高于 92%。对 1 ng/mL THC、THC-OH 和 THC-COOH 的分析得到了理想的峰形，并获得了良好的信噪比 (S/N)。在 0.5 至 100 ng/mL 范围内获得的响应呈线性， R^2 高于 0.99。获得的定量限在 1.0 ng/g 以下，RSD 小于 11.5%。在三天的实验过程中，得到的结果一致。

前言

在法医学实验室中，LC-MS/MS 分析之前高效的样品前处理是一个重要考虑因素。样品前处理可用于减少系统污染并改善数据完整性、方法选择性、分析灵敏度和可靠性。全血中存在的两种主要干扰物为蛋白质和磷脂 (PPL)。PPL 已被确定为 LC-MS/MS 生物分析中引起基质效应的主要来源，因为在电喷雾电离 (ESI) 期间所形成的液滴表面上会发生竞争电离¹。

常用的法医学样品前处理技术包括蛋白质沉淀 (PPT)、固相萃取 (SPE)、液液萃取 (LLE) 和介质液液萃取 (SLE)。每种技术在速度、成本和生成数据的质量方面各有优劣。例如，PPT、LLE 和 SLE 无法去除 PPL，而 SPE 执行起来更耗时且更复杂²。然而，在这些技术中，PPT 得到了最广泛的认可。PPT 以规定的比例向生物样品中加入有机沉淀溶剂（如乙腈 (ACN) 或甲醇 (MeOH)），可轻松高效地除去蛋白质。随着蛋白质的变性，它们形成的沉淀可通过过滤或离心得以去除。但 PPT 无法去除 PPL，因为 PPL 能够溶于有机沉淀溶剂中。

大麻物质类是支持案件调查的法医学实验室中最常见的目标分析物之一。快速、准确地确认并定量生物样品中的 Δ^9 -THC (THC) 及其主要代谢物 11-羟基- Δ^9 -THC (THC-OH) 和 11-nor-9- Δ^9 -羧基-THC (THC-COOH) 至关重要。然而，THC 及其代谢物在样品前处理过程中容易发生非特异性结合。

迫切需要一种全血样品前处理方法，在减少样品前处理步骤（包括离线 PPT、离心、转移和稀释）的同时实现简化的孔内 PPT 和 PPL 去除。本应用简报介绍了一种借助 Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL 过滤柱去除干扰物质（特别是 PPL）的方法，该方法采用简单的直通形式，不会引起分析物损失。所得的提取物更洁净，减少了潜在的离子抑制以及色谱柱和质谱仪污染。

依次使用孔内 PPT 和 Captiva EMR-Lipid 过滤柱去除 PPL，对全血中的 THC、THC-OH 和 THC-COOH 进行提取。随后使用 Agilent 6490 三重四极杆液质联用系统进行定量分析。对 PPL 去除率进行了评估。还测定了 THC 及其代谢物的日间（3 日）准确度、精密度和回收率。

有关血浆样品的分析，请参见安捷伦应用简报使用 *Captiva EMR-Lipid* 和 LC-MS/MS 对人血浆中的 THC 和代谢物进行高效定量分析³。

实验部分

试剂与化学品

Δ^9 -THC、11-羟基- Δ^9 -THC、11-nor-9- Δ^9 -羧基-THC、 Δ^9 -THC-d3、11-羟基- Δ^9 -THC-d3 和 11-nor-9-羧基- Δ^9 -THC-d9 购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)。LC-MS/MS 级甲酸铵同样购自 Sigma-Aldrich。所有溶剂均为液相色谱级或更高级别，均购自 Burdick and Jackson (Muskegon, MI, USA)。

溶液

在甲醇中配制浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 THC 及其代谢物 THC-OH 和 THC-COOH 的混标工作溶液。将氘代 THC-d3、THC-OH-d3 和 THC-COOH-d9 混合到工作溶液中，浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ （溶于甲醇中），并用作内标 (IS)。

校准标样和质量控制样品

在预加标质量控制 (QC) 样品中加入适当浓度的标准工作溶液，平行配制七份。QC 样品为低浓度 QC (LQC)、中等浓度 QC (MQC) 和高浓度 QC (HQC)，分别对应于全血中 1、10、50 ng/mL 的浓度。在每种浓度的 QC 样品中，添加浓度为 50 ng/mL 的氘代混标溶液 (IS)。

在经过 Captiva EMR-Lipid 净化的空白基质中，用 THC 及其代谢物的工作溶液后加标，其加标浓度分别对应于全血中 1、10、50 ng/mL 的浓度。另外，还加入一份 5 μL 的 1.0 $\mu\text{g/mL}$ IS 溶液。

基质匹配校准曲线由标准工作溶液制得。对经过 Captiva EMR-Lipid 净化的空白基质进行后加标，加标浓度对应于提取物中 0.5、1、5、10、50、100 ng/mL 的浓度。在每种浓度的校准标样中加入 5 μL 1.0 $\mu\text{g/mL}$ IS。

设备与仪器

表 1 列出了用于执行分析的设备与仪器。

表 1. 样品前处理和分析所用的设备与仪器

组件	部件号
样品前处理	
Agilent Captiva EMR-Lipid, 1 mL 过滤柱	5190-1002
Agilent Vac Elut SPS 24 多管装置, 配备可容纳 12 个 75 mm 试管的收集架	12234041
Eppendorf 移液管和重复移液器 (VWR, NJ, USA)	
液相色谱系统	
Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统	G4204A
Agilent 1290 Infinity 系列柱温箱	G1316C
Agilent 1290 Infinity 自动进样器	G4226A
Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) Bonus RP 2.1 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱	857768-901
Agilent 1290 Infinity 在线过滤器, 0.3 μm	5067-6189
样品瓶内插管, 400 μL, 玻璃, 平底, 去活	5183-2086
MS 分析用的样品瓶套件。2 mL 棕色螺口样品瓶, 带书写签, 蓝色螺口盖和 PTFE/硅橡胶隔垫。	5190-2280
质谱系统	
Agilent 6490 三重四极杆液质联用系统	
Agilent MassHunter 软件	

LC-MS/MS 分析

采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱与 Agilent 6490 三重四极杆质谱的联用系统进行 LC-MS/MS 分析。表 2 和表 3 列出了液相色谱和质谱条件。样品在放入自动进样器之前不经稀释。在进样之前使用 1290 Infinity 自动进样器的稀释功能, 其中在吸取 5 μL 样品之前吸取 10 μL 稀释剂 (水)。将整个体积进样至液相色谱系统中。使用自动进样器的在线稀释功能, 与自动进样器样品瓶中稀释样品相比, 其优势在于样品可 100% 保留在有机相中, 大多数化合物在此条件下更稳定。

表 4 列出了三重四极杆多反应监测 (MRM) 采集参数, 其中包括母离子、定性离子、定量离子、碰撞能量 (CE) 和保留时间。为评估 Captiva EMR-Lipid 的 PPL 去除率, 对 11 种 PPL 的 MRM 离子对进行监测, 如表 5 所示。

表 2. 液相色谱条件

参数	值										
色谱柱	Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) Bonus RP 2.1 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱										
流速	0.5 mL/min										
柱温	50 °C										
自动进样器温度	5 °C										
进样量	5 μL										
进样器程序	以默认速度从位置 “P2-F1” 抽取 10 μL 以默认速度抽取 5 μL 样品 根据方法中的规定清洗针头										
流动相	A) 5 mM 甲酸铵水溶液 (含 0.1% FA) B) 5 mM 甲酸铵的甲醇溶液 (含 0.1% FA)										
进样针清洗	1:1:1:1 ACN:MeOH:IPA:H ₂ O (含 0.2% FA)										
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>0.1</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>4.0</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>95</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0.0	65	0.1	65	4.0	95	5.0	95
时间 (min)	%B										
0.0	65										
0.1	65										
4.0	95										
5.0	95										
停止时间	5.10 分钟										
后运行时间	1.5 分钟										

表 3. 质谱条件

参数	值
电离模式	ESI
干燥气温度	120 °C
干燥气流速	20 L/min
雾化器压力	50 psi
鞘气温度	325 °C
毛细管电压	3500 V
充电电压	300
Delta 电子倍增器电压 (EMV)	200
极性	正

表 4. THC 化合物的 MRM 采集参数

化合物	母离子	定量离子 (CE)	定性离子 (CE)	保留时间 (min)
THC-OH	331.23	313.2 (12)	193.1 (24)	1.70
THC-OH-d3	334.25	316.3 (12)		1.70
THC	315.23	193.2 (24)	123.0 (44)	3.05
THC-d3	318.25	196.1 (28)	28	3.04
THC-COOH	345.21	299.1 (20)	327.3 (12)	2.26
THC-COOH-d9	354.27	336.2	12	2.26

表 5.11 种 PPL 化合物的 MRM 采集参数

母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量
808	184	30
806	184	30
786	184	30
784	184	30
760	184	30
758	184	30
704	184	30
524	184	30
522	184	30
520	184	30
496	184	30

使用 Agilent MassHunter 软件进行仪器控制以及定性和定量数据分析。还测定了由该方法得到的 THC 及其代谢物的日间 (3 日) 准确度、精密度和回收率。

样品前处理过程

1. 将 500 μL 低温* 15:85 MeOH:ACN 加入 Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL 过滤柱中
 2. 加入 100 μL 人全血样品
 3. 用一次性玻璃移液管进行孔内充分混合, 或被动混合 5-7 分钟
 4. 抽真空至 3.5-4 psi
 5. 加入 200 μL 的低温 1:4 H_2O :ACN
 6. 抽真空直至整个体积通过过滤柱, 然后将压力提高至 11-13 psi, 使剩余溶剂完全通过过滤柱
 7. 将溶剂蒸发, 然后复溶于 100 μL MeOH (含 0.1% 甲酸 (FA)) 中
 8. 将 5 μL 样品与用于稀释的 10 μL 水直接进样至液相色谱系统中进行分析
- * 低温 15:85 MeOH:ACN 储存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中, 在使用时放入冷冻容器中

注: 有关血浆样品的分析, 请参见安捷伦应用简报使用 Captiva EMR-Lipid 和 LC-MS/MS 对人血浆中的 THC 和代谢物进行高效定量分析³。

常用并推荐使用 1:3 至 1:5 的样品/溶剂比, 以实现蛋白质完全沉淀。使用低温 MeOH/ACN 溶剂是引起红细胞溶血或破裂 (溶解) 的简便方法。该方法使红细胞的内容物 (细胞质) 释放到周围的血浆中, 形成粉状沉淀, 如图 1 所示。

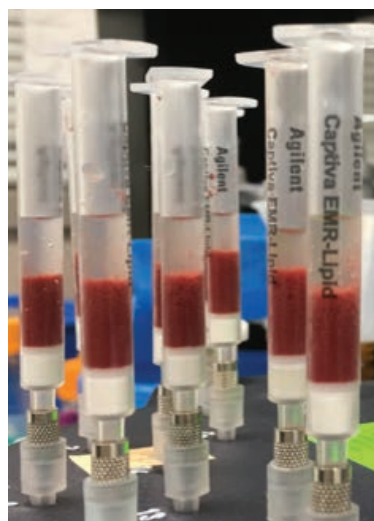


图 1. 经主动混合后的全血在抽真空之前形成粉状沉淀

优先使用大口径移液枪头或其他混合装置进行主动孔内混合。真空促使液流通过 Captiva EMR-Lipid 过滤柱。推荐使用每 3-5 秒一滴的受控流速, 以实现最佳脂质去除。在样品从过滤柱洗脱后, 施加更高的真空度以最大程度提高样品回收率。

结果与讨论

去除不需要的脂质基体

EMR-Lipid 方法简便，通用于极性、中等极性和非极性的目标物分析，可消除基质效应并改善分析物回收率。EMR-Lipid 利用独特的吸附剂化学作用，用水活化 EMR-Lipid 吸附剂后，能通过体积排阻和疏水性相互作用选择性捕集脂类（图 2）。脂类上的无支链烃链进入吸附剂中，而体积较大的分析物并不进入其中。然后，进入吸附剂中的脂链通过疏水相互作用被捕集。PPL 是细胞膜的主要成分，大量存在于全血中。PPL 是由磷酸酯和胆碱单元组成的亲水性头部基团以及由长链烷基组成的疏水性尾部构成。

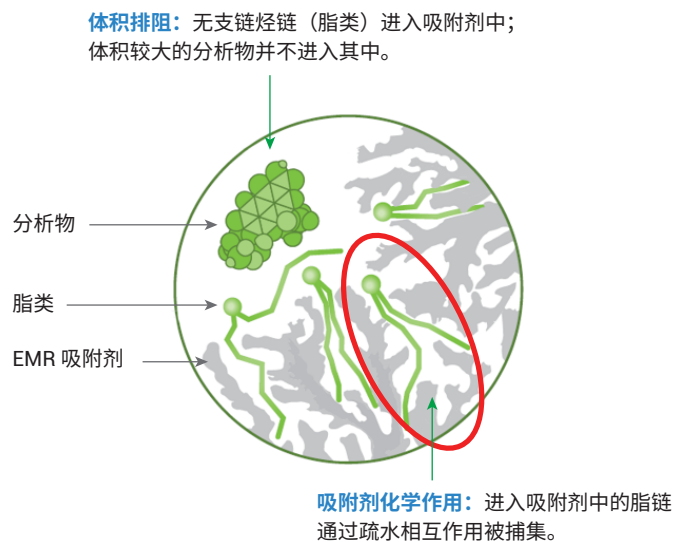


图 2. EMR-Lipid 作用机制：体积排阻和吸附剂化学作用

尽管图 3 所示的分析物 THC、THC-OH 和 THC-COOH 包含直碳链，但其碳链不够长，无法与 EMR 吸附剂形成稳定的疏水相互作用。此外，分析物体积较大的环结构妨碍了吸附剂对它们的保留。

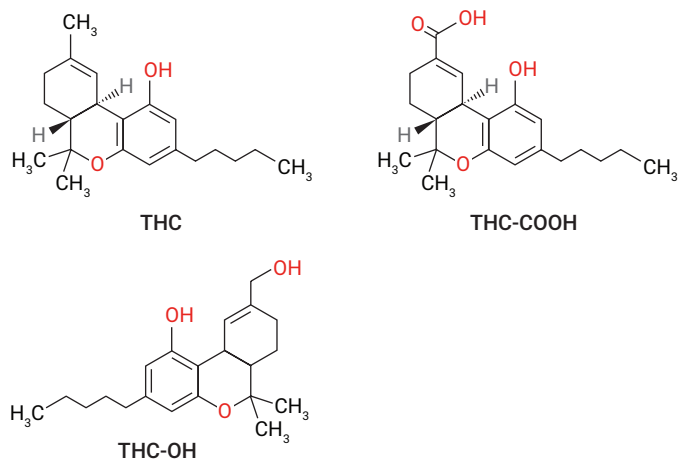


图 3. THC 及其代谢物结构

EMR-Lipid 技术以 96 孔板或 1 mL 过滤柱形式提供，并包含用于孔内 PPT 的溶剂保留滤芯，适用于需要高通量的应用。这一独特的设计最大程度减少了堵塞的发生。

色谱性能

含 1 ng/mL THC、THC-OH 和 THC-COOH 预加标全血的 MRM 色谱图 (图 4) 显示了使用 EMR-Lipid 方案所获得的色谱性能。即使在 1 ng/mL 的浓度下, 由于基质效应和干扰降低而获得了理想的峰形, 它为实现准确积分提供了良好分离度和信噪比 (S/N)。为确定损伤而实施的法医学分析, 通常需要 5 ng/mL 的浓度以达到准确检出和定量。

磷脂去除

利用 LC-ESI-MS/MS 直接分析全血乙腈粗提取物 (仅经过 PPT 处理) 中的 THC 及其他大麻类物质, 会受到共洗脱 PPL 的明显离子抑制作用的影响。这种干扰主要由溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰乙醇胺类 PPL 引起^{4,5}。

为确定使用 Captiva EMR-Lipid 去除全血中 PPL 的效果, 对 11 种天然存在的 PPL 进行监测。具体而言, 利用 m/z 184 处的磷脂酰胆碱子离子碎片来监测全血提取物中经蛋白质沉淀和 Captiva EMR-Lipid 除脂之后的 PPL。

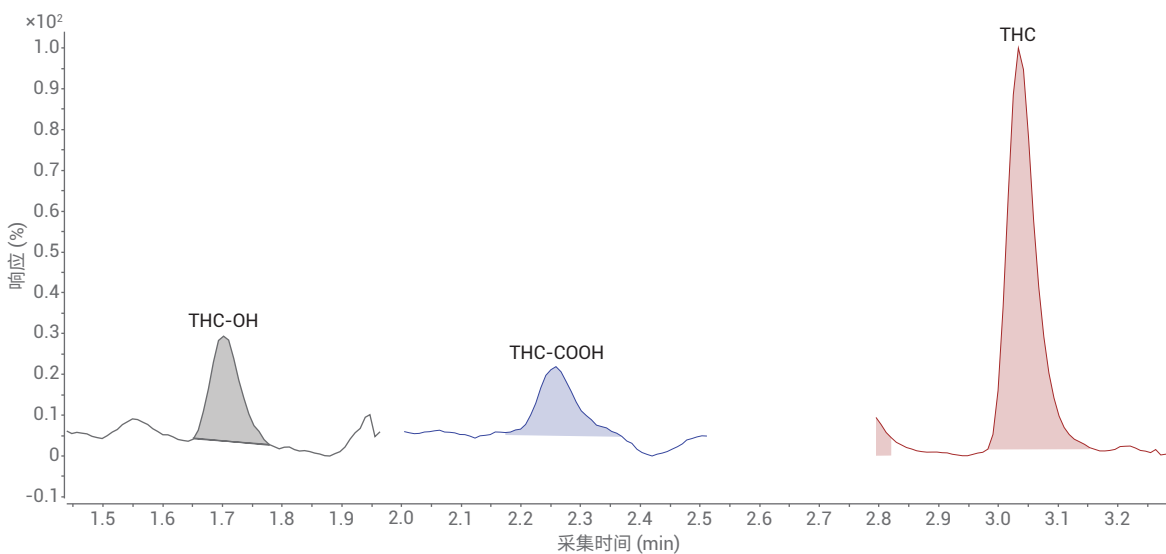


图 4. 预加标浓度为 1 ng/mL 的全血的 MRM 色谱图

图 5 示出 97% PPL 从提取的全血样品中被去除, 其中一些 PPL 可能与目标分析物发生了共洗脱⁶。图 5 中示出的高丰度 PPL (黑色迹线; 仅采用低温 MeOH:ACN (15:85) 进行 PPT) 可能使检测器达到饱和, 并可能影响定量分析的质量。此外, 高丰度 PPL 可能随时间推移而污染质谱系统。

定量性能

对 THC 及其代谢物的校准曲线的线性进行了评估。图 6 表明在测试的六种浓度下 (0.5–100 ng/mL, n = 5) 观察到良好的响应线性。以全血中 0.5–100 ng/mL 范围内的线性, 1/x 加权及线性回归拟合, 各条曲线的平均决定系数 (R^2) 均高于 0.99。

分析灵敏度优异, 在全血中待测化合物的定量限 (LOQ) 为 1.0 ng/g 或更低。方法 LOQ 的确定依据是 %RSD \leq 15 且 S/N \geq 10。以 1、10、50 ng/mL 的标准品浓度加标至全血中来测定方法重现性, 重复测定七次。图 7 的表中示出 RSD 在 2.4% 至 11.5% 的范围内, 对于该基质是可以接受的。

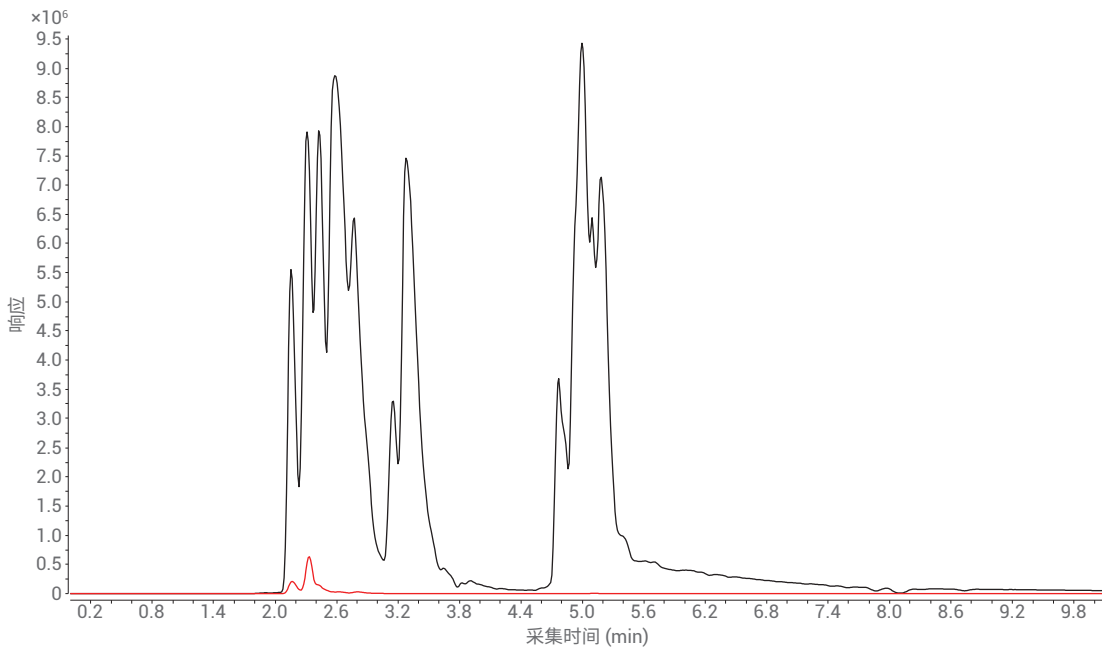


图 5. 采用 (红色迹线) 和不用 (黑色迹线) Agilent Captiva EMR-Lipid 脂质去除产品时, 在子离子 m/z 184 处监测到的 11 种 PPL 的 MRM 色谱图

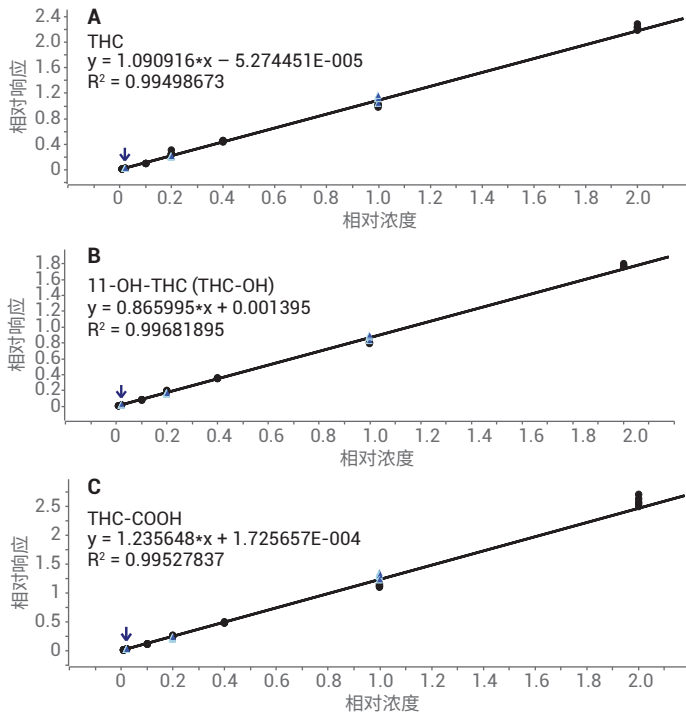
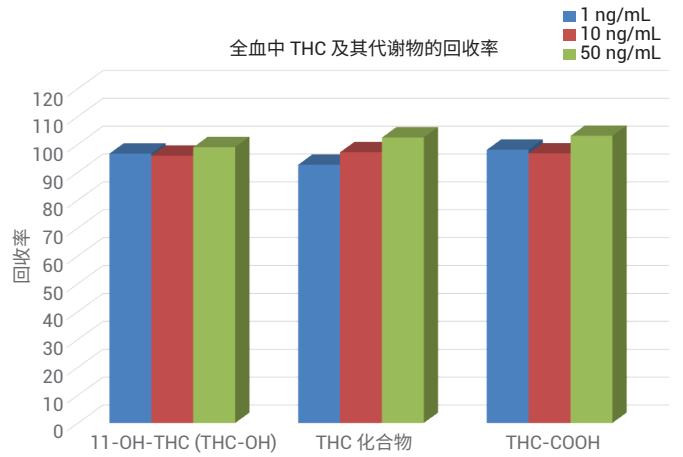


图 6. 校准曲线。A) THC; B) THC-OH; C) THC-COOH。全血中的浓度范围为 0.5-100 ng/mL, $n = 5$



化合物	1 ng/mL		10 ng/mL		50 ng/mL	
	回收率	%RSD	回收率	%RSD	回收率	%RSD
THC-OH	96.7	11.5	95.9	3.5	99.0	2.4
THC	92.7	6.2	97.2	2.8	102.5	3.5
THC-COOH	98.1	9.2	96.8	3.7	103.1	3.6

图 7. 全血中 THC 及其代谢物的方法 %RSD (第 1 天)

在第 3 步的 PPT 过程中进行主动混合，能够使 THC 及其代谢物 THC-OH 和 THC-COOH 获得 92.7% 至 103.1% 的最佳回收率，RSD 小于 11.5%，校准曲线 R^2 达到 0.99。被动 PPT 得到的回收率为 91% 至 105%，RSD 小于 10%，而校准曲线 R^2 为 0.98。Captiva EMR-Lipid 采用独特的 PPL 去除机制，因此获得了令人满意的回收率。其他技术通常无法区分 PPL 与 THC (LogP = 7.6) 等疏水性化合物。

在 3 天时间内，1、10、50 ng/mL 浓度下得到的日间方法回收率和精密度始终保持良好，处于 93.4% 至 109.2% 的范围内，RSD 小于 11.5%。

结论

本应用简报介绍了一种简便而快速的全血样品前处理工作流程，适用于对全血样品中的 THC 及其代谢物进行 LC-MS/MS 的法医学分析。依次使用孔内 PPT 和 Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL 过滤柱去除 PPL，对全血中的 THC 及其主要的两种代谢物 (THC-OH 和 THC-COOH) 进行提取。Captiva EMR-Lipid 能够高效去除全血基质中 97% 以上不需要的 PPL，并使目标分析物获得优异的回收率。所得到的样品提取物比单独使用 PPT 得到的提取物更洁净，从而减少了潜在的离子抑制、LC-MS/MS 系统污染和停机的可能。孔内 PPT 具有减少样品处理和转移的优点。

对 1 ng/mL THC、THC-OH 和 THC-COOH 的分析得到了理想的峰形和良好的 S/N，该浓度低于确定损伤所需的浓度。七种浓度下 (0.5–100 ng/mL) 的 THC 及其代谢物的响应呈线性， R^2 高于 0.99。获得的 LOQ 在 1.0 ng/g 以下，RSD 小于 11.5%。对于所检测浓度下的 THC 及其代谢物，回收率罕见地高达 92% 或更高。在 3 天的重复分析过程中，结果保持一致。

Captiva EMR-Lipid 方法可轻松融入现有工作流程中，无需额外的样品前处理装置或玻璃器皿。在 96 孔板或 1 mL 过滤柱形式中，Captiva EMR-Lipid 可兼容自动化系统，适用于高通量应用。滤芯设计可轻松高效洗脱样品，不易发生堵塞。

参考文献

1. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, *75*(13), 3019-3030
2. Jamey, C.; et al. Determination of Cannabinoids in Whole Blood by UPLC-MS-MS. *J. Analytical Tox.* **2008**, *32*, 349-354
3. Stevens, J.; Zhao, L. 使用 Captiva EMR-Lipid 和 LC-MS/MS 对人血浆中的 THC 和代谢物进行高效定量分析，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-8636ZHCN，**2017** 年 10 月
4. Elian, A.; Hackett, J. Solid-Phase Extraction and Analysis of THC and Carboxy-THC from Whole Blood Using a Novel Fluorinated Solid-Phase Extraction Sorbent and Fast Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Analytical Tox.* **2009**, *33*, 461-468
5. Sorensen, L; Hasselstrom, J. Sensitive Determination of Cannabinoids in Whole Blood by LC–MS-MS After Rapid Removal of Phospholipids by Filtration. *J. Analytical Tox.* **2017**, *41*, 382-391
6. Zhao, L.; Lucas, D. Efficiency of Biological Fluid Matrix Removal Using Agilent Captiva EMR-Lipid Cleanup (使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 去除生物体液基质的净化效率)，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-8006EN，**2017** 年 7 月

www.agilent.com

用于法医鉴定。

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017
2017 年 11 月 6 日, 中国出版
5991-8635ZHCN