

使用 Agilent 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

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) 已被确定为血浆的 LC-MS/MS 分析中引起基质效应的主要来源。本应用简报介绍了血浆样品前处理以及血浆中四氢大麻酚 (Δ^9 -THC 或 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 LC-MS/MS 分析。样品前处理时采用孔内蛋白质沉淀法 (PPT) 和 Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL 过滤柱直通净化去除 PPL。Captiva EMR-Lipid 过滤柱能够得到更洁净的洗脱液, 去除血浆基质中 99% 以上不需要的 PPL, 目标分析物的回收率高于 90%, RSD 小于 10%。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 0.5–100 ng/mL 范围内获得的响应呈线性, R^2 高于 0.99。血浆中的定量限 (LOQ) 为 1.0 ng/g 或更低。在 3 天的实验过程中, 得到的结果一致。

前言

在法医学实验室的日常样品分析中，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、方法选择性和分析灵敏度。血浆中存在的两种主要干扰物质为蛋白质和磷脂 (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。蛋白质易于通过简单的样品前处理方法（如蛋白质沉淀 (PPT)）去除，但 PPL 则难以得到有效去除。

法医学实验室中常用的样品前处理技术包括 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。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)），可轻松去除蛋白质。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。PPL 无法通过 PPT 去除，因为这种物质溶于有机沉淀溶剂中，在过滤或离心后仍保留在样品中。

大麻类物质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）的同时实现高效蛋白质和 PPL 去除，并使目标分析物获得令人满意的回收率。本应用简报介绍了一种在 PPT 之后使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 去除 PPL 的方法，该方法通过简单的直通净化步骤即可完成，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 1 mL 过滤柱去除 PPL，对血浆中的 THC、THC-OH 和 THC-COOH 进行萃取。随后使用 Agilent 6490 三重四极杆液质联用系统进行定量分析。对 EMR-Lipid 过滤柱净化去除 PPL 的效率进行了评估。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。

有关全血样品的分析，请参见安捷伦应用简报使用 *Captiva EMR-Lipid 和 LC-MS/MS 对全血中的 THC 及其代谢物进行高效定量分析*²。

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、THC-OH 和 THC-COOH 的混标工作溶液。在甲醇中配制浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 THC-d3、THC-OH-d3 和 THC-COOH-d9 的氘代内标 (IS) 工作溶液。

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)，分别对应于血浆中 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血浆中 1、10、50 ng/mL 的浓度。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 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 系列柱温箱	G1316C
Agilent 1290 Infinity 自动进样器	G4226A
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 分析用的样品瓶套装, 包括带书写签的 2 mL 棕色螺口样品瓶、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。表 2 和表 3 列出了液相色谱和质谱条件。将 EMR-Lipid 过滤柱净化后的样品洗脱液直接进样分析, 无需进一步稀释。在进样之前使用 Agilent 1290 Infinity 自动进样器的在线稀释功能, 其中在吸取 5 μL 样品之前吸取 10 μL 稀释剂 (水), 并将整个体积进样至液相色谱系统中。采用在线稀释而非样品瓶中样品稀释, 其优势在于样品可 100% 保留在有机相中。这样避免了分析物发生降解。

表 4 列出了多反应监测 (MRM) 采集参数。为评估 Captiva EMR-Lipid 对 PPL 去除率, 采用表 5 所示的 MRM 离子对监测 11 种 PPL 化合物。

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 V
Delta 电子倍增器电压 (EMV)	200 V
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	327.3 (12)	299.1 (20)	2.26
THC-COOH-d9	354.27	336.2	12	2.26

表 5. PPL 化合物的 MRM 采集参数

母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)
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。实验中测定了方法的日间 (3 日) 准确度、精密度和回收率。

样品前处理过程

1. 将 500 μL ACN (含 1% 甲酸 (FA)) 加入 Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL 过滤柱中
2. 加入 100 μL 人血浆
3. 在孔内充分混合
4. 抽真空至 1.5–3 psi
5. 加入 200 μL 的 1:4 H_2O :ACN
6. 抽真空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. 在 45 $^\circ\text{C}$ 下用氮气吹干, 然后复溶于 100 μL MeOH (含 0.1% FA) 中
8. 将 5 μL 样品与用于稀释的 10 μL 水直接进样至 LC 系统中进行分析

注: 有关全血样品的分析, 请参见安捷伦应用简报使用 Captiva EMR-Lipid 和 LC-MS/MS 对全血中的 THC 及其代谢物进行高效定量分析²。

用 MeOH 进行 PPT 所形成的沉淀物比用 ACN 形成的沉淀物更细, 因此推荐使用 ACN 最大程度实现 PPT, 并避免在 Captiva EMR-Lipid 处理之前发生胶凝。推荐使用 1:3 至 1:5 (样品/溶剂) 的比例。在加入沉淀溶剂之后加入样品。酸 (甲酸) 有助于分解蛋白质并减少蛋白质对目标物的结合。

优先使用大口径移液枪头进行主动孔内混合。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

高效去除脂质基体

EMR-Lipid 方法简单通用, 能够降低基质效应并改善分析物回收率。EMR-Lipid 吸附剂通过体积排阻作用和疏水相互作用选择性捕集脂类 (图 1)。无支链烃链 (脂类) 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 的脂质去除率高于 99%, 并具有较高的分析物回收率。

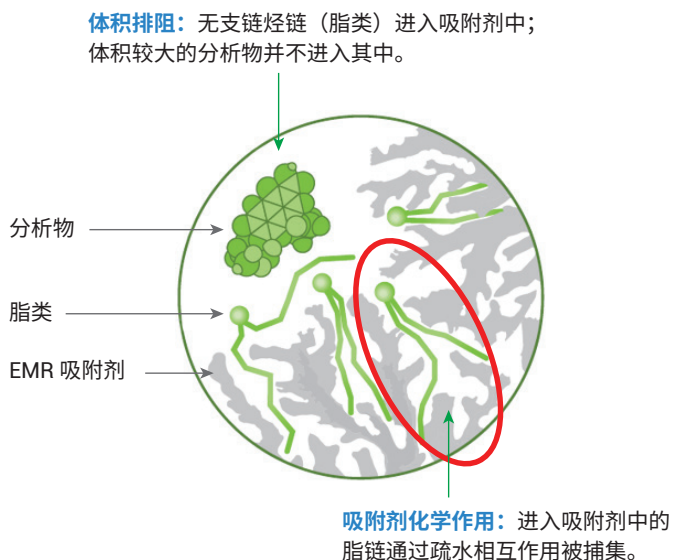


图 1. EMR-Lipid 作用机制: 体积排阻和吸附剂化学作用

PPL 是细胞膜的主要成分, 大量存在于血浆中。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。EMR-Lipid 留住具有长碳链的脂肪族化合物, 如 PPL、游离脂肪酸和甘油三酯。EMR-Lipid 与具有支链、短碳链或有官能团 (如羧酸、磷酸胺、胺、酰胺、羰基或羟基) 的化合物不发生相互作用。

尽管图 2 所示的分析物 THC、THC-OH 和 THC-COOH 包含无支链碳链，但其碳链不够长，无法通过与吸附剂的疏水相互作用被捕集。此外，分析物体积较大的环结构也妨碍了吸附剂对它们的保留。

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 的加标血浆的 MRM 色谱图（图 3）显示了依次使用孔内 PPT 和 EMR-Lipid 过滤柱净化所获得的色谱图。即使在 1 ng/mL 的浓度下，由于基质效应和干扰的降低，理想峰形为准确积分提供了良好的分离度和信噪比 (S/N)。在执行确定损伤的法医学分析时，通常需要对 5 ng/mL 的浓度实现准确检测和定量。

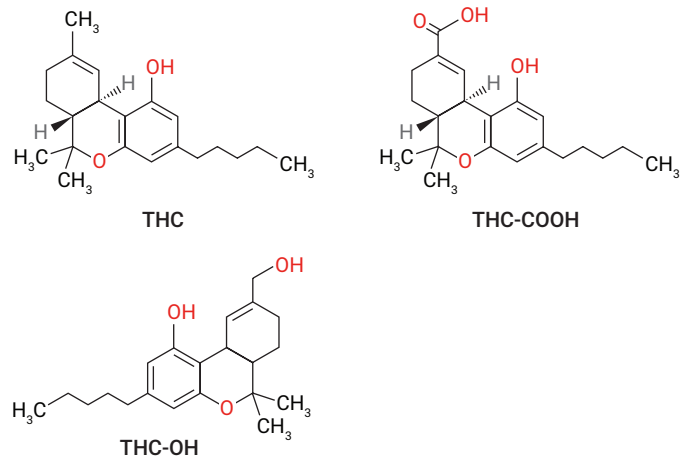


图 2. 常见的 THC 相关分析物结构

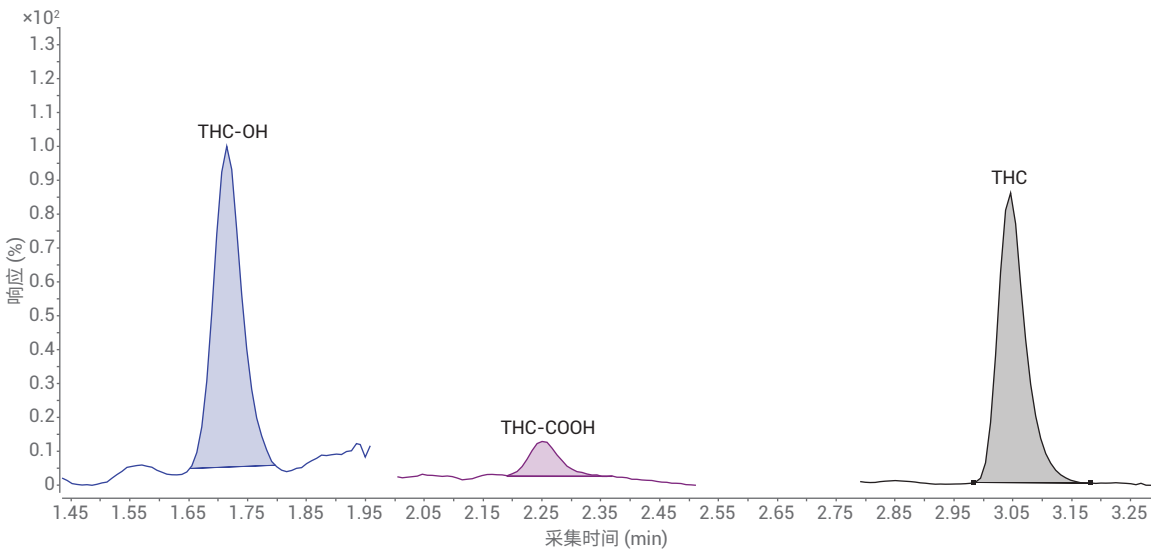


图 3. 加标浓度为 1 ng/mL 的血浆的 MRM 色谱图

PPL 去除

PPL 是细胞膜的主要成分，也是引起显著基质效应的主要化合物类别^{3,4}。甘油磷酸胆碱和溶血磷脂酰胆碱分别占总血浆 PPL 的 70% 和 10%⁵，是基质效应的主要来源。为确定使用 Captiva EMR-Lipid 去除血浆中 PPL 的效果，对 11 种天然存在的 PPL 化合物进行监测。

图 4 示出 99% 的 PPL 从提取的血浆样品中被去除，其中一些可能与目标分析物发生了共洗脱⁶。图 4 中示出的高丰度 PPL（黑色迹线；仅采用含 1% FA 的 ACN 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。

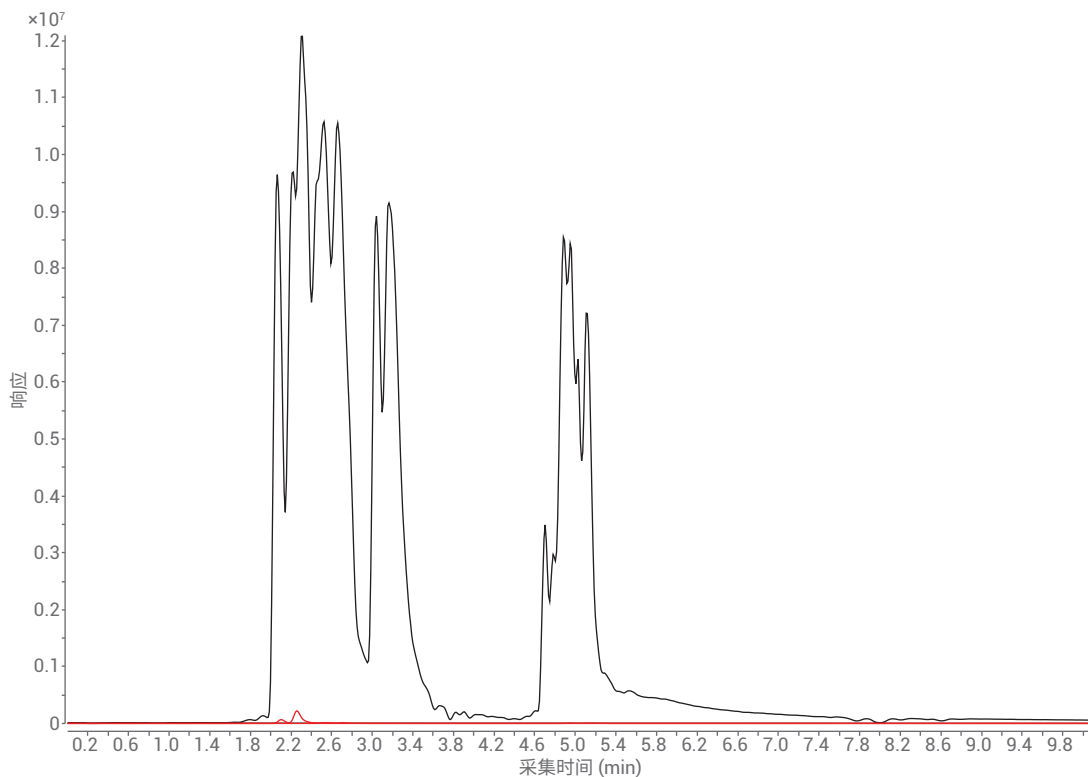


图 4. 采用（红色迹线）和不用（黑色迹线）Agilent Captiva EMR-Lipid 脂质去除产品时，在子离子 m/z 184 处监测到的 11 种 PPL 的 MRM 色谱图

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 5 表明在测试的六种浓度下 (0.5–100 ng/mL, n = 5) 观察到良好的线性响应。以 0.5–100 ng/mL 浓度范围内的线性, 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。

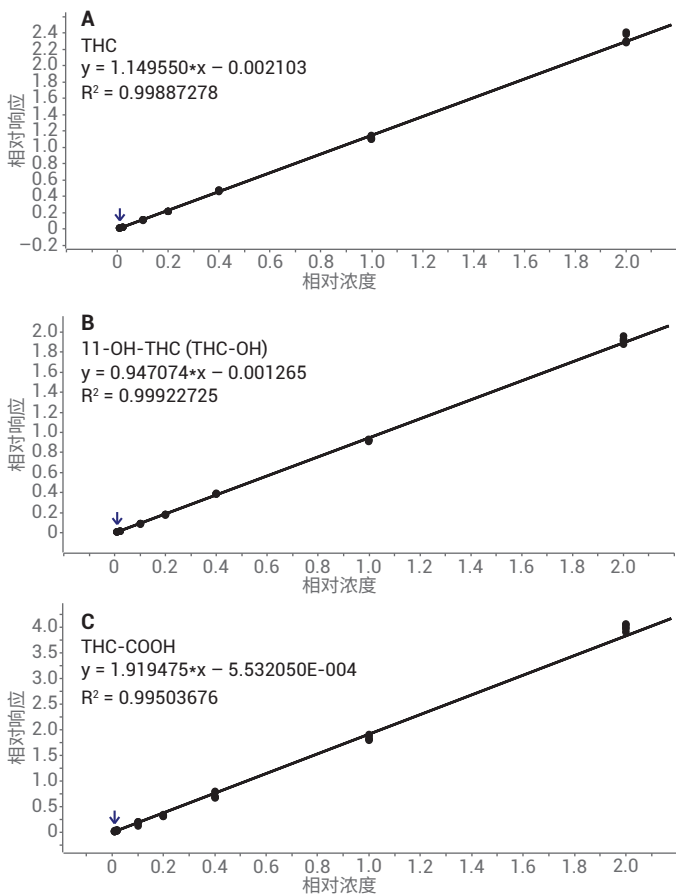
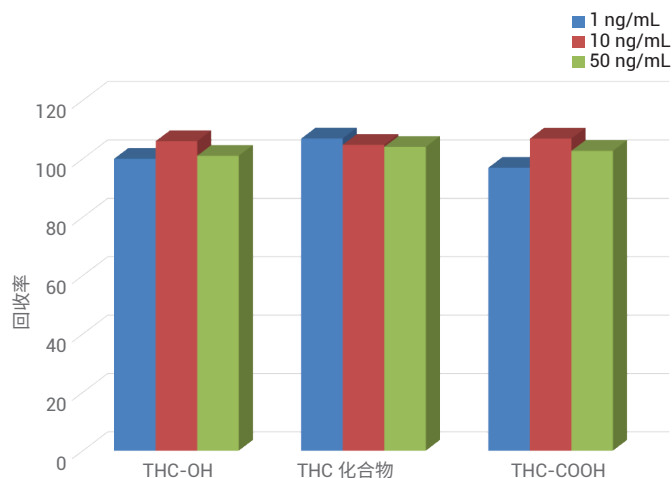


图 5. 校准曲线。A) THC; B) THC-OH; C) THC-COOH。
血浆中的浓度范围为 0.5–100 ng/mL, n = 5

分析灵敏度优异, 血浆中目标化合物的 LOQ 为 1.0 ng/g 或更低。方法 LOQ 的确定依据是 $\%RSD \leq 10$ 且 $S/N \geq 10$ 。

以 1、10、50 ng/mL 的标准品浓度加标至血浆中来测定方法重现性, 重复测定七次。图 6 的表中示出 $\%RSD$ 介于 1.2 至 7.6 之间, 均在可接受范围内。浓度为 1、10、50 ng/mL 的 THC 及其代谢物 THC-OH 和 THC-COOH 的回收率优异, 处于 97% 至 107% 的范围内, RSD 小于 7.6% (图 6)。Captive 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 ($\text{LogP} = 7.6$) 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 98.6% 至 116.9% 的范围内, RSD 小于 10%。



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	100	7.6	106	1.4	101	1.4
THC	107	1.2	105	3.2	104	3.2
THC-COOH	97	5.6	107	4.2	103	4.2

图 6. 血浆中的 THC 及其代谢物的方法回收率和精密度 (%RSD) (第 1 天)

结论

本应用简报介绍了一种简便而快速的血浆样品前处理工作流程，用于对 THC 及其代谢物进行法医学研究的 LC-MS/MS 分析。依次采用孔内 PPT 和 Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL 过滤柱净化来提取血浆中的目标分析物。Captiva EMR-Lipid 能够去除血浆基质中 99% 以上的 PPL，并使目标分析物获得优异的回收率。样品提取物比单独使用 PPT 获得的提取物更洁净，从而减小了基质离子抑制作用，并改善了分析准确度、精密度和重现性。更洁净的提取物还减少了对 LC-MS/MS 系统的污染以及可能由维护带来的停机时间。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 5 ng/mL 浓度。血浆中处于 0.5–100 ng/mL 范围内的校准曲线呈线性，其中 R^2 高于 0.99。获得的三种分析物的 LOQ 为 1.0 ng/g 或更低，RSD 小于 10%。回收率高达 90% 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。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

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
5991-8636ZHCN

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. Stevens, J.; Zhao, L. 使用 Captiva EMR-Lipid 和 LC-MS/MS 对全血中的 THC 及其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 5991-8635ZHCN，**2017**
3. Little, J. L.; Wempe, M. F.; Buchanan, C.M. Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: Examining lipid matrix ionization effects in plasma. *J. Chromatogr. B* **2006**, 833, 219
4. Ismaiel, O. A.; et al. Monitoring phospholipids for assessment of matrix effects in a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for hydrocodone and pseudoephedrine in human plasma. *J. Chromatogr. B* **2007**, 859, 84–93
5. Chambers, E.; et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J. Chromatogr. B* **2007**, 852, 22–34
6. Zhao, L.; Lucas, D.; Efficiency of Biological Fluid Matrix Removal Using Agilent Captiva EMR-Lipid Cleanup (使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化去除生物体液基质的效率)，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-8006EN，**2017**