

# 您视为“足够好”的样品前处理方法真的足够好吗？

## 脂类及基质去除不理想的隐患

### 前言

多年来，分析人员不断优化实验室工作流程，以使其尽可能高效且易于管理。用于生物样品前处理的蛋白质沉淀 (PPT) 和用于食品样品前处理的 QuEChERS 的普及便是用简化方法实现复杂样品前处理的成功范例。如果让您描述自己当前的工作流程，您可能会说您的工作流程已足以完成工作。但是那些“足够好”的样品前处理方法真的足够好吗？

您的实验室工作流程面临着诸多挑战，同时您需要不断提高效率或通量指标。典型的工作流程包括样品采集、样品前处理、引入仪器、分析、数据审查以及最终的数据报告，其中样品前处理一直被视为瓶颈和限速步骤。当前先进的仪器已大大提高了分析各种样品的能力，能够满足复杂样品检测所需的灵敏度、选择性、可靠性和可行性要求。因此，对样品前处理步骤进行最大程度缩减，以缩短时间、降低成本和复杂性、增加通用性，并且已缩减至“足够好”的地步。

您的工作流程是最重要的。样品前处理不理想会带来若干隐患，例如浪费时间、仪器维护/故障问题和数据不准确，这些隐患均可能爆发并影响您的整体成功。利用适当的样品前处理工作流程策略，能够消除或大大减少这些隐患。无需重新培训您的科学家、无需大笔资本支出或重新编写标准操作程序 (SOP)，即可实现这一改进。

本白皮书概述了您日常分析中遇到的一些已知的样品干扰物质，并识别出一些鲜为人知的隐藏障碍，如果您未对样品前处理工作流程中的基质去除进行优化，则可能会遇到这些障碍。除了解已知和未知的后果之外，您还将了解到一种全新的解决方案，该解决方案能够提高技术人员效率，改善您的分析效率，并降低分析仪器污染风险。它能够提高回收率和重现性，并且您无需大幅修改 SOP、牺牲通量，也不会增加工作流程的复杂性。现在，这才应该是您所谓的“足够好”的样品前处理！

## 分析人员为何需要进行样品净化？

进行样品前处理的两个主要原因是：

- 去除不必要基质
- 浓缩目标分析物

本白皮书着眼于未有效进行基质去除所带来的明显或不太明显的问题。

不需要的基质组分如果不经处理或未能充分去除，将会污染仪器流路。在 GC、GC/MS 和 GC/MS/MS 分析中，非挥发性基质共萃取物对进样口、分流平板和色谱柱等气相色谱流路组件具有不利影响（图 1）。在 LC、LC/MS 和 LC/MS/MS 分析中，基质颗粒物和盐类会损坏阀、在线过滤器和液相色谱柱。基质共萃取物会对质谱离子源产生严重的离子抑制（图 2），进而影响方法的可靠性。尽管大



图 1. “足够好”的样品前处理程序对气相色谱系统组件的污染

多数分析化学家在将样品进样至流路系统之前都会对样品进行过滤以避免上述已知危害，并且过滤也是最大程度减小颗粒物基质效应的有效方法，但是对于不需要的溶解态基质该如何处理？如果仅仅采用过滤，这些溶解态基质最终去了哪里？

图 2 表明，未去除不需要的溶解态基质共萃取物将对您的分析硬件产生不利影响，这些基质共萃取物可能是溶解态盐、色素、蛋白质、脂类等。

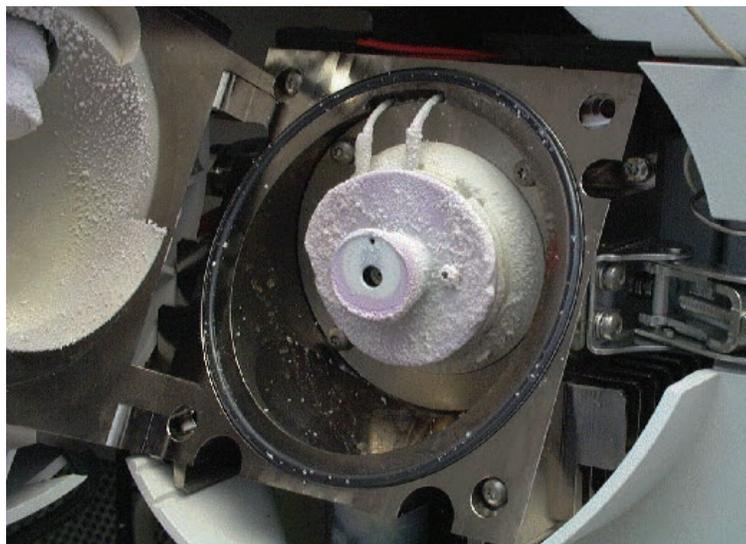


图 2. “足够好”的样品前处理程序中未去除的盐类在 LC/MS 离子源中的积聚

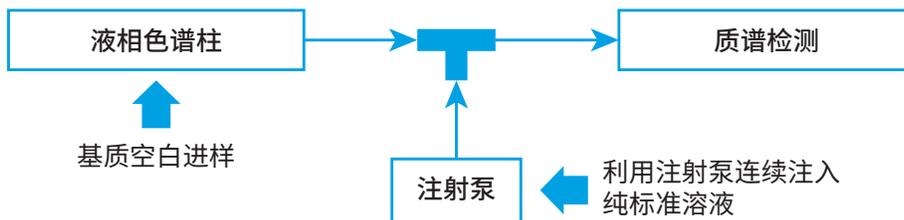


图 3. 用于基质离子抑制效应评估和对比研究的标样柱后流动注射设置图

质谱具有高灵敏度和选择性，是各种应用的首选分析方法。然而，基质组分造成的离子抑制或离子增强会对准确度、精度和稳定性带来不利影响（表现为相对标准偏差 (RSD) 较高）。柱后流动注射是一种鉴定由基质引起的离子抑制或离子增强的技术，图 3 为此类实验的典型设置（参见应用简报 5991-8007CHCN<sup>3</sup>）。

如果进行这一对比研究，您将发现您认为“足够好”的样品前处理方法可能达不到所需的高效率。安捷伦样品前处理解决方案能帮助您让“足够好”的样品前处理方法更加高效可靠。

## 脂类的影响有多严重？

在所有样品基质共萃取物中，最具挑战性但也常被忽略的组分可能是脂类，这是由于它们难以高效去除，并且其积聚在物理上不可见。在柱后流动注射实验中（如图 3 所示），可通过连续注入基质空白来评估血清或血浆等对质谱信号的基质效应。信号强度的任何变化都可以表明基质中存在引起离子抑制或增强的物质。

示例（图 4 中的第二区和第三区）显示出了脂类对数据质量的严重影响。尽管蛋白质沉淀法可高效去除生物基质中丰富的蛋白质，但是无法去除可能导致显著

离子抑制的磷脂。（参见应用简报 5991-8007CHCN<sup>3</sup>）。

数据质量不佳将严重降低整个实验室的分析效率。

下面列出了在 LC/MS/MS 或 GC/MS/MS 分析中基质去除效果不佳可能给分析效率带来的一些影响：

### 方法可靠性和数据质量

- 不可接受的方法灵敏度和选择性
- 不可接受的校准线性
- 方法准确度和精度不佳
- 难以实现峰鉴定和积分

### 方法适用性

- 更长的方法开发和优化时间
- 更多方法故障排除
- 各种检测能否执行取决于基质
- 更多样品重复运行次数

### 质谱仪洁净度

- 更频繁的质谱离子源清洁
- 更频繁的毛细管清洁或更换
- 无法形成或保持真空度
- 额外的故障排除

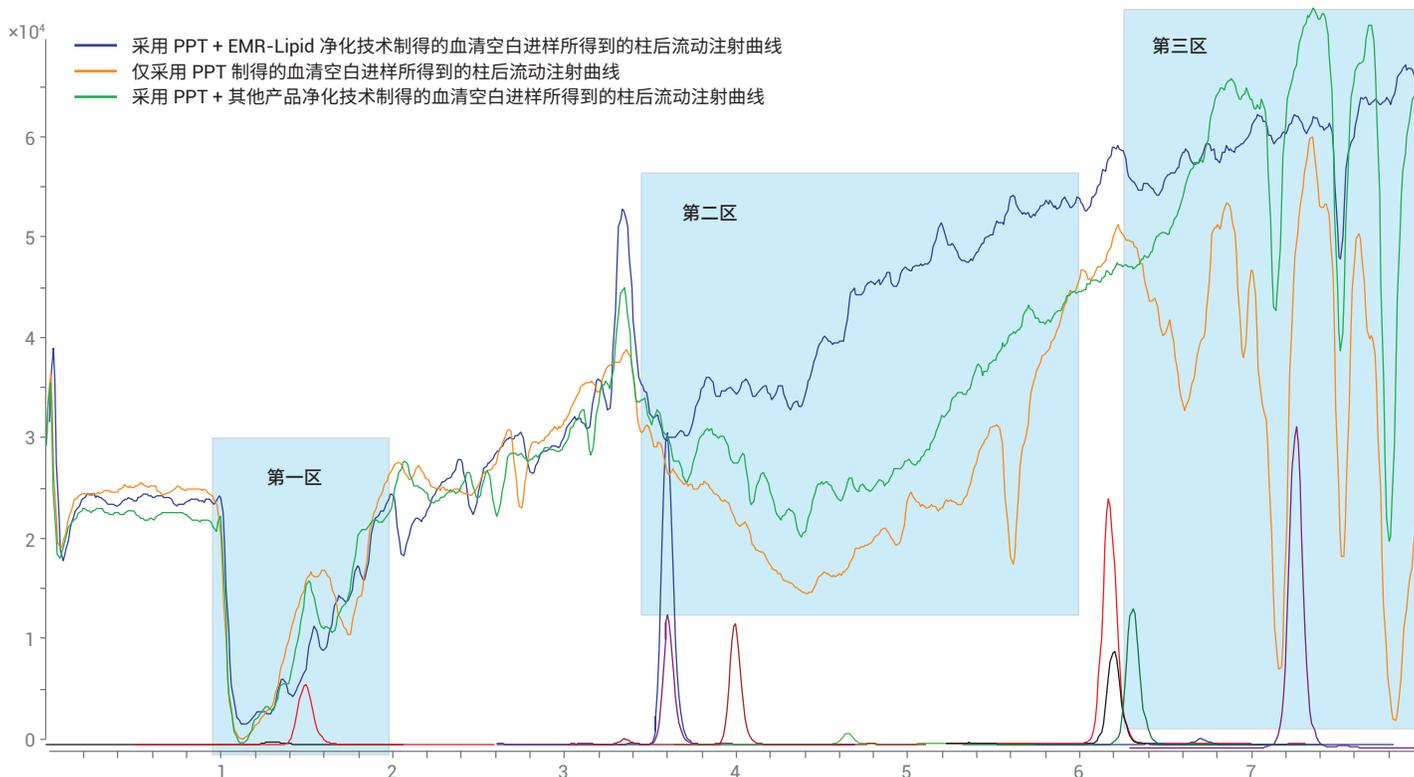


图 4. 标样柱后流动注射曲线对比以及基质离子抑制对目标分析物的影响

## 脂类在色谱柱中积聚

- 缩短了液相色谱柱和气相色谱柱测试寿命
- 更频繁的气相色谱进样口维护
- 更频繁的气相色谱柱切割
- 液相色谱柱背压
- 更频繁的系统冲洗或平衡
- 运行时间延长

虽然已有脂质去除工作流程，但现有的样品净化方法通常会在去除脂类的同时去除一部分目标分析物，从而影响分析物回收率。许多分析人员已经认识到，应对这种情况的办法是增加维护次数、更频繁地更换消耗品或采用更全面的样品前处理技术。最后一种方法可成功提高数据质量，但会显著增加成本、时间以及对专业知识的要求，继而导致分析效率降低。

## 为什么仅仅执行“足够好”的样品前处理方法不是一种可行的解决方案？

为获得更高质量的数据并显著提高分析效率，需要采用更出色且更简单的方法来去除脂类和一般基质。为实现这些目标，安捷伦开发出了 Captiva EMR-Lipid，该产品可通过简化的工作流程有效净化样品。Captiva EMR-Lipid 方法简单且普遍适用，能够降低脂类基质效应，获得良好的分析物回收率。

对于具有挑战性的复杂样品（如食品或生物基质样品），需要确定哪种样品前处理技术最适合您的目标分析物。许多技术较为复杂且费时费力，并且可能仍然存在化合物回收率不高和基质干扰问题。针对样品前处理方法的一个常见要求是：方案简单步骤少。样品净化必须有效去除基质干扰物质，最大程度减小对各种分析物回收率的影响。

表 1. 离心型传统板上 PPT（96 孔板）与将过滤型 PPT 和 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化（96 孔板）相结合的方法的对比

传统 PPT（96 孔板） (离心)			PPT + Captiva EMR-Lipid 净化（96 孔板） (过滤)		
步骤	所需时间 (min)	所需消耗品	步骤		
板标签和样品等分	30	96 个枪头 (小尺寸) 1 个收集板	板标签和样品等分	30	96 个枪头 (小尺寸) 1 个收集板 1 个 EMR-Lipid 板
内标加入	5	1 个重复用移液器枪头	内标加入	5	1 个重复用移液器枪头
样品混合	2	板盖	样品混合	2	板盖
沉淀溶剂添加	5	1 个重复用移液器枪头	沉淀溶剂添加	5	1 个重复用移液器枪头
样品混合	5	板盖	样品混合	5	仅用于主动混合的板盖
离心	10		过滤	10	
上清液转移, 收集板标签	30	96 个枪头 (中尺寸) 1 个收集板		不定	1 块板垫
样品后处理	不定	1 块板垫	样品后处理		
所需的总样品前处理时间	后处理 <b>87 分钟</b>		所需的总样品前处理时间	后处理 <b>57 分钟</b> (节省约 30% 的时间)	
仪器运行时间和溶剂用量	100%		仪器运行时间和溶剂用量	< 90% (时间和溶剂用量至少节省 10%)	
基质去除	仅蛋白质		基质去除	蛋白质和脂类	

假设试图鉴定与各种基质组分混杂在一起的目标化合物，如图 5 的牛油果萃取物的气相色谱全扫描色谱图所示，其中显示了未经后处理（不佳）、经过 C18 净化（不够好）和经过 EMR-Lipid 净化（最佳）的谱图结果。

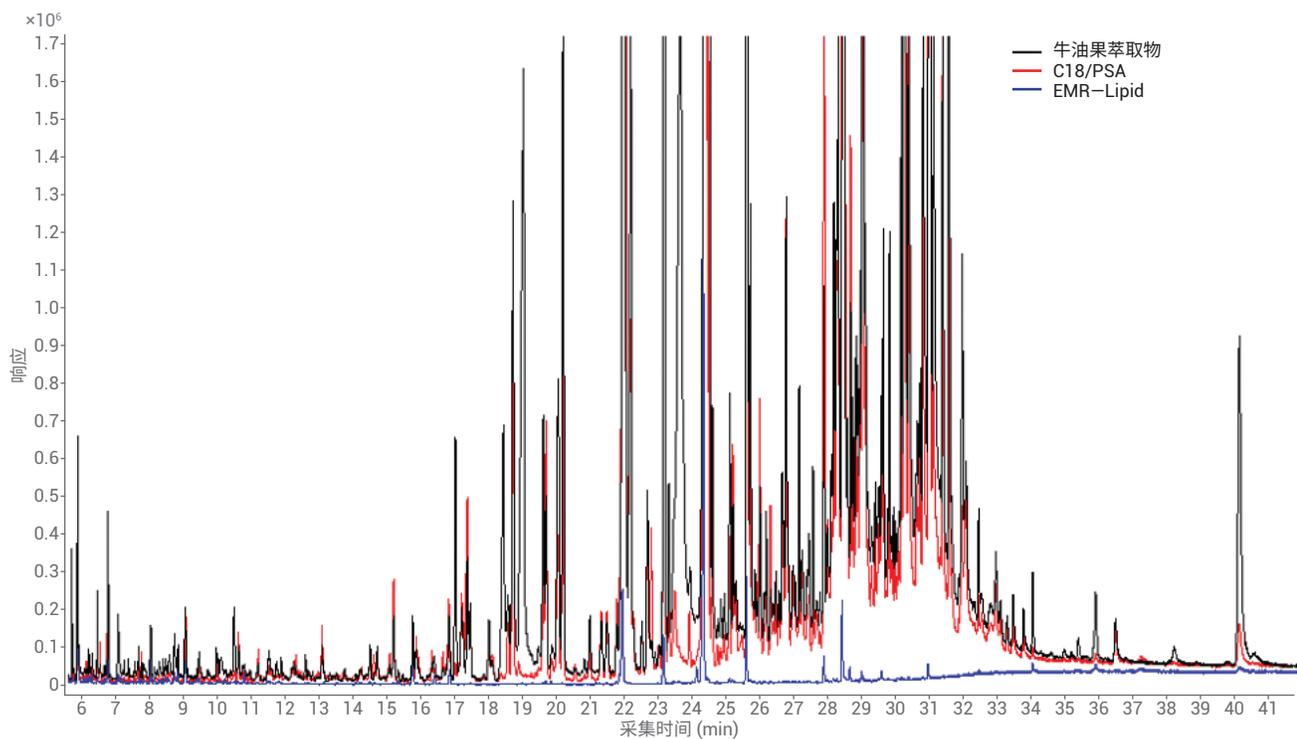


图 5. 未经处理的 QuEChERS 牛油果萃取物（黑色）与经传统 C18/PSA 净化（红色）和 Agilent EMR-Lipid（蓝色）处理后的萃取物生成的 GC/MS 全扫描色谱图的叠加对比

脂类会导致严重的基质离子抑制，进而降低检测灵敏度和方法重现性。生物基质中的磷脂一直非常棘手，因为它们会导致严重的基质效应。图 6 表明，在维生素 D 代谢物的分析中，经过 Captiva EMR-Lipid 净化的样品相比于仅采用 PPT 的样品，分析物响应明显增加并且 RSD 更优异。

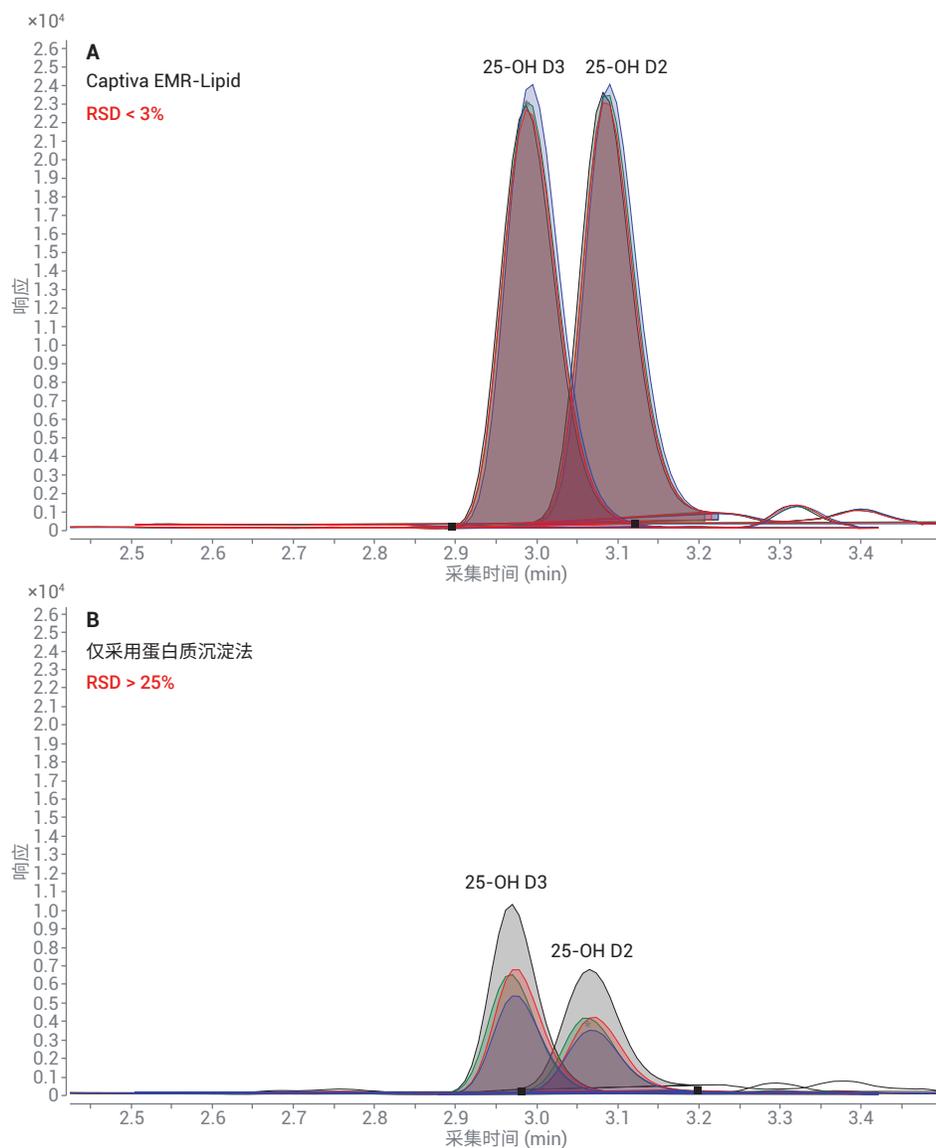


图 6. 仅采用 PPT 和采用 EMR-Lipid 与 PPT 相结合的方法所获得的分析物响应和 RSD 值对比

## 现在我们能够有效去除脂类，那么如何才能加快分析速度？

借助 Captiva EMR-Lipid，不仅能改善分析方法可靠性和数据质量，还能缩短分析运行时间并提高实验室分析效率。图 7

表明，由于在样品引入之前充分去除了磷脂，因此无需等待这些疏水性化合物在反相色谱中洗脱，从而节省了宝贵的仪器时间。

由于样品更加洁净，您的分析速度得以加快，并且无需经常进行系统冲洗。更洁净的样品也意味着您能够在计划的预防性维

护时间之间运行更多的样品。即在当前的实验室容量下，您的实验室能获得更高的样品通量和经济收益。

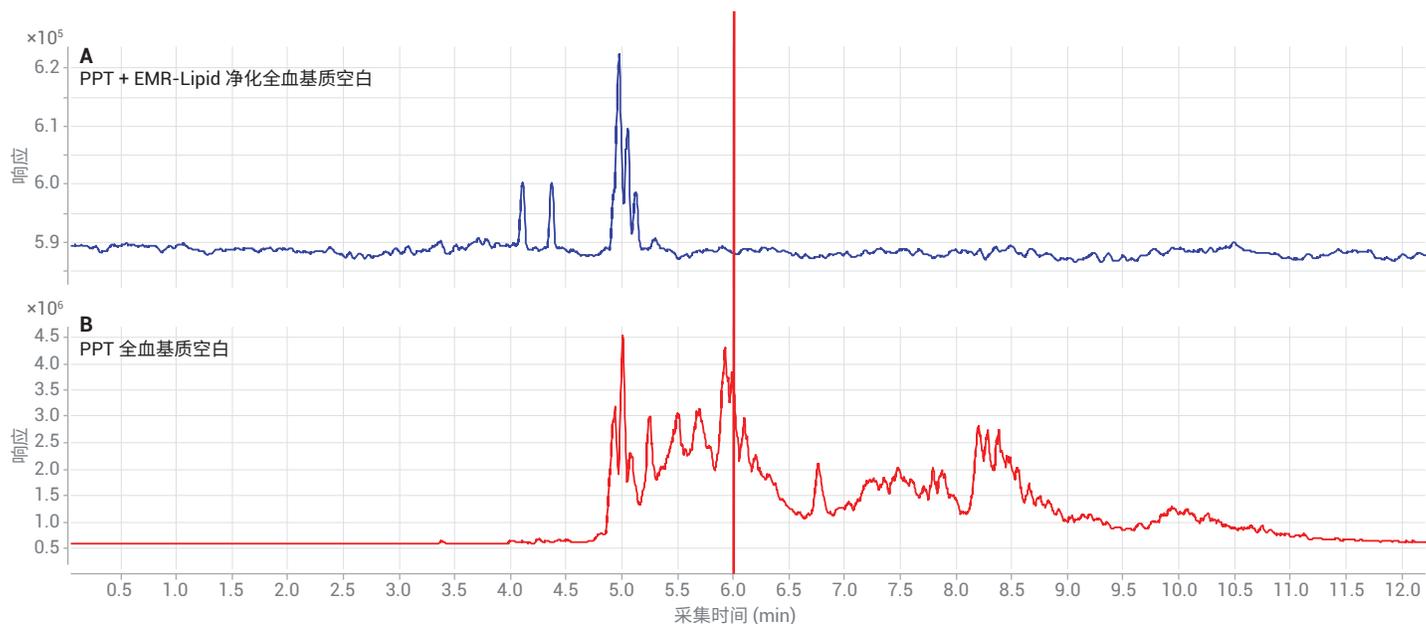


图 7. 基质空白磷脂曲线对比，证明了缩短分析周期的可行性

## 结论

样品净化为何如此重要？因为复杂样品中包含许多棘手的基质组分，其中包括脂类、蛋白质、盐类、色素等。出于多种原因，脂类是最棘手的基质组分之一。

使用更出色的样品前处理工作流程相比使用足够好的样品前处理工作流程的优势在于，您将获得更长的仪器正常运行时间，减少实验室分析人员耗费在工作台前的时间，并且能加快分析速度，从而在每天运行更多的样品。必须及时执行维护的最终原因在于基质污染。如果去除了更多的基质，你将能减少维护次数。如今，可在无

需更改 SOP 或延长工作流程时间的情况下实现这点。若未进行样品前处理，可能无法清楚识别目标峰以对它们进行准确的定量分析。事实上，您甚至可能完全观察不到目标峰。所有这些问题都会增加数据处理所需的时间，并且由于数据质量不佳，可能会增加需要重新运行的样品和批次数量。

## 了解关于 Agilent Captiva EMR-Lipid 的更多信息

[www.agilent.com/chem/Captiva-EMR-Lipid](http://www.agilent.com/chem/Captiva-EMR-Lipid)



Agilent Captiva EMR-Lipid 净化产品

## 了解关于安捷伦样品前处理技术带来的分析效率提升的更多信息

[www.agilent.com/chem/did-you-know](http://www.agilent.com/chem/did-you-know)

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

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

安捷伦科技大学：

<http://www.lasca-china.com.cn/agilent>

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊：

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

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

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，2018  
2018年8月6日，中国出版  
5994-0110ZHCN

## 推荐的应用简报

1. 使用 LC/MS/MS 对人全血中的滥用药物进行定量测定，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-9251ZHCN
2. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 96 孔板进行生物体液样品的蛋白质沉淀，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-9222ZHCN
3. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化对人血清中的药物进行 LC/MS/MS 定量分析，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-8007CHCN
4. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 分析生物样品中的维生素 D 代谢物，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-7956CHCN
5. 分析牛肉中的多类别兽药多残留，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-8598ZHCN

是否关注兽药分析？您还可以参阅 *Journal of Chromatography A* 上的期刊论文。

Multiclass multiresidue analysis of veterinary drugs in meat using enhanced matrix removal lipid cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 1549, 14-24