

# 快速建立 LC-MS/MS 分析生物样品的方法

张娟红 王 荣 谢 华 贾正平\* 张 强

(兰州军区兰州总医院临床药理基地, 兰州, 730050)

**摘 要** 近年来,液相色谱质谱联用技术取得了较大进展,该技术可对药物及其体内代谢产物进行定性、定量分析,在药物代谢研究中得到广泛应用。然而,如何更快更好地建立生物样品分析方法还有待进一步研究。本文对 LC-MS/MS 分析生物样品时如何优化质谱条件和流动相,如何制备样品以减小基质效应,以及仪器维护的经验等问题进行探讨,总结出若干快速建立 LC-MS/MS 分析生物样品的方法。

**关键词** LC-MS/MS 生物样品分析 基质效应

## 1 前 言

生命分析化学的重点在于为生命科学研究提供高效、简便、准确的分析手段,要求分析化学与生物、生化等相关学科更加紧密地结合;而生命分析化学所面临的巨大挑战之一,是分析工作必须在极其复杂的样品基质中进行<sup>[1]</sup>;生命分析化学面向的对象往往是成分、形态复杂的生物样品,例如组织提取液、血液、尿液等。这类样品不仅需要费时、费力的前处理过程以使其转化为易分析的形态,而且往往含有成千上万种化合物,这些杂质大大干扰了待测组分的分析。如何在如此复杂的基质中高灵敏度、高选择性、高准确性和高通量地分析待测组分,是生命分析化学急需解决的重要问题。目前,主要有两个途径:第一,采取多种前处理手段,最大限度除去杂质,简化基质,使样品能够符合分析的要求。第二,采用高选择性分析手段和分析方法,以实现生物样品的定量分析。而上世纪 90 年代随着大气压离子化(APCI)及电喷雾离子化(ESI)等接口技术的迅速发展,液相色谱—串联质谱联用(LC/MS/MS)技术是目前公认的选择性最好的复杂样品分析技术之一<sup>[1-3]</sup>。其次,在药代动力学研究中,经常需要对生物样品中的微量乃至痕量成分进行定量分析,常规的分离检测技术难以满足复杂介质中痕量成分准确定量的要求,LC-MS/MS 以其高灵敏度和高选择性,在这一领域的应用日益广泛并趋于常规化<sup>[4]</sup>。但是在生物样品的分析测定中,基质效应是一个重要的影响因素,制约了该项技术的迅速发展。基质

效应(matrix effect)是指标本中除分析物以外的其他成分对分析物测定值的影响,干扰了分析方法准确测定分析物的能力。简单的说,基质效应就是样品中的共流出物对待测物离子化过程的影响,分为离子抑制和离子增强两种,影响了待测物的准确定量<sup>[5-7]</sup>。

本文通过对生物样品 LC-MS/MS 分析测定中质谱条件、流动相、样品制备方法等如何进行优化以减小基质效应、仪器保护以及工作中的经验等问题的探讨,总结出若干快速、灵敏和可靠的 LC-MS/MS 方法,可用于快速分析生物样品。

## 2 优化质谱分析条件

### 2.1 化合物的性质

首先了解化合物性质,对化合物的结构、极性及 pKa 值必须清楚。根据化合物的结构,可以大概推断其碎片离子的断裂方式,选择较为稳定的碎片离子作为定量反应的子离子,也可以根据经验判断选用哪种离子源更为合适;根据化合物的极性大小,可以选择一种或几种恰当的溶剂作为溶媒,既能保证完全将样品溶解,又能提高化合物的质谱响应;而根据化合物的 pKa 值,有助于我们选择流动相的添加剂及其 pH 值,从而提高质谱响应<sup>[8,9]</sup>。同时应注意药物在体内的存在形式及血浆蛋白结合率数值,以便采取适宜的预处理方法,提高质谱响应值<sup>[10]</sup>。

### 2.2 质谱离子源的选择

充分掌握离子源的特性,根据被分析化合物的

性质选择离子源。质谱出现早期,主要有电子轰击源(EI)、化学电离源(CI),但随着科学技术的发展,离子源的发展也日新月异,电喷雾电离源(ESI)和大气压化学电离源(APCI)为更好地分析化合物提供了极为有效的分析手段。目前,用于定量的离子源主要是ESI和APCI,ESI源是液相离子化,主要用于分析极性比较大的化合物及大分子化合物;而APCI源是气相离子化,主要用于分析极性较小的小分子化合物。从目前研究结果看,基质效应主要对ESI方式有显著影响,对大气压化学电离(APCI)的影响尚未见相关报道。因而,若采用ESI方式时存在显著基质效应,可考虑改用APCI方式<sup>[11,12]</sup>。

### 2.3 参数优化

在掌握以上基本信息后,进行定量检测之前根据各个型号仪器的标准操作规程(SOP)进行操作,对各个参数进行优化,进行一级和二级质谱扫描时温度和电压的优化极为主要,但其他参数如气体流速、锥体电压、离子源温度、分辨率等参数也要进行细致地优化,这样会极大地提高离子的灵敏度,以确定最佳的质谱分析方法<sup>[13]</sup>。

## 3 色谱条件的建立

### 3.1 流动相的性质要求

理想的液相色谱流动相溶剂应具有低粘度、与检测器兼容性好、易于得到纯品和低毒性等特征。流动相应不改变填料的任何性质,对样品的溶解度要适宜,故应选用挥发性溶剂。所有溶剂使用前都必须经 $0.45\mu\text{m}$ (或 $0.22\mu\text{m}$ )滤膜过滤,以除去杂质微粒,色谱纯试剂也不例外(除非在标签上标明“已滤过”)。用滤膜过滤时,特别要注意分清有机相(脂溶性)滤膜和水相(水溶性)滤膜。有机相滤膜用于过滤有机溶剂,如过滤水溶液时流速低或滤不动。水相滤膜只能用于过滤水溶液,严禁用于有机溶剂,否则滤膜会被溶解。所用流动相必须预先脱气,在系统内逸出的气泡,影响泵的工作,气泡还会影响柱的分离效率,影响检测器的灵敏度、基线稳定性,甚至无法检测<sup>[14,15]</sup>。

流动相的选择也应依据具体的分离情况而进行调整。用极性较强的甲醇/水作流动相时,如果得到的色谱图峰型较宽,可以加大水的比例以增大流动相的极性,使色谱图峰型变窄。如果分离效果较好但保留时间太长,可加大甲醇的比例以便化合物更

易洗脱。而对于一些难分离的物质,选用乙腈/水作流动相较甲醇/水效果好一些,由于乙腈的加合离子比甲醇加合离子比例更高,因此选择乙腈流动相系统<sup>[16,17]</sup>。

### 3.2 改善色谱分析条件

在液相色谱紫外检测中,要求化合物之间的分离必须达到完全分离,即分离度( $R$ ) $\geq 1.5$ ,如果进行定量, $R$ 应大于 $2.0$ ,因此,应准确地配制流动相,精确地调好流动相的pH及添加剂的浓度<sup>[18,19]</sup>。但在液质定量分析中,由于质谱检测中所采用多反应监测(MRM)方法,要求准确选择好被检测化合物的母离子和子离子,因此,它具有很高的专属性,基于这点,在对多个化合物同时进行检测时,不需要彼此间达到完全分离就可以对他们进行定量分析。但需要强调的是,由于生物样品中大量基质的存在会严重的干扰和影响化合物的测定,因而需要利用色谱方法将化合物与基质分开,从而降低基质效应的影响,即降低离子抑制<sup>[20]</sup>。

采用反相色谱法分离时,最初流出的主要是基质中的极性成分,这些极性成分往往是引起基质效应的主要原因。当待测组分的色谱保留时间较短时( $<3\text{ min}$ ),其受基质效应的影响较大。改善色谱分析条件,适当地增加待测组分的保留时间( $>3\text{ min}$ ),有利于减少基质效应的影响。改善多组分间(如药物、内标和代谢物等)的色谱分离也是减少干扰的有效方法。另外,减少进样体积也可减少基质效应的影响。在保证灵敏度的情况下,尽量采用小的进样体积。标准加入法也是一种补偿基质的信号抑制作用的有效方法<sup>[20,21]</sup>。

### 3.3 流动相添加剂的选择

在液相-紫外检测中,使用的添加剂的种类繁多,可以是挥发性的酸或者碱(如甲酸、乙酸和氨水等),也可以是不易挥发的缓冲盐(如磷酸二氢钠-磷酸缓冲液、磷酸二氢钾-磷酸缓冲盐)。但是在液质分析中,基于质谱检测的原理,只能使用可挥发的酸碱或缓冲盐,流动相的种类就会受到极大的限制。在日常LC-MS/MS分析中使用的添加剂主要有甲酸、乙酸、三氟乙酸、氨水和甲酸铵、乙酸铵等缓冲盐。三乙胺在紫外检测中,常作为扫尾剂,而在液质检测中是绝对禁止的。因为三乙胺进入质谱后不易清除,残留及其严重,能够抑制离子的响应。一旦三乙胺用量增加,长时间使用,质谱检测灵敏度将会降

低<sup>[22]</sup>。

## 4 内标的选择

检测时使用内标物的目的是消除操作误差,因此,在进行生物样品分析时必须选择一个合适的化合物作为内标物。理想的内标应该与待测组分在包括样品制备、色谱分离和质谱检测的全过程中具有相似的行为并且对待测组分的提取、测定无任何干扰。在提取过程中,内标应能追踪待测组分,以补偿待测组分提取回收率所发生的变化。LC-MS/MS法的高专属性使其对内标物与待测物的色谱分离要求不高,但要求内标物色谱行为及提取回收率,尤其是质谱信号响应应与待测物接近,以消除操作误差和补偿待测组分由于基质效应的影响所引起的响应信号的改变<sup>[23]</sup>。所以理想的内标物应为待测组分的同位素标记物,但由于同位素标记物价格非常昂贵且不易获得,应选用结构相似的化合物(或者同系物)作为内标物<sup>[24]</sup>。

## 5 样品制备方法的选择

选择合适的样品制备方法是最有效的消除基质效应影响的方法。样品制备可以在线进行,也可离线进行。常采用的离线样品制备方法有液-液萃取(LLE)、固相萃取(SPE)、蛋白沉淀(PP)等<sup>[25-27]</sup>。实验时可同时采用几种不同的样品制备方法,从中选择基质效应最小的样品制备方法<sup>[28]</sup>。对不同的样品制备方法,应根据每种组分对基质效应的敏感程度进行选择。

在线样品制备近年来应用增多,如阀切换、在线SPE、二维液相色谱-质谱等方法。阀切换方法是在待测组分流前后将基质组分作为废液排出,可大大减少基质组分的量。在线SPE是一种快速的、有效的样品制备方法<sup>[29,30]</sup>。二维液相色谱-质谱利用柱反冲技术可有效去除复杂样品中的基质组分。柱反冲技术利用第1根色谱柱将待测组分保留在色谱柱上而使基质组分流出去,然后再将第1根色谱柱上的待测组分反冲到第2根色谱柱上进行色谱分离。生物样品制备的目的是为去除基质中干扰物质,以减少基质效应的影响。但样品制备过程中会或多或少地带来待测组分的损失,直接影响待测组分的提取回收率。因而在样品制备方法选择中要兼顾基质效应和提取回收率两方面因素,选择

合适的样品制备方法<sup>[31]</sup>。

在生物样品预处理中,经常使用到的方法主要有以下三种:LLE、SPE和PP法,这三种方法的选择,主要取决于化合物的特性。分析极性比较大的化合物,优先考虑使用PP法,这种方法操作简单,省时省力,缺点是生物基质中内源性物质去除不彻底,基质效应较大,使得方法灵敏度不高;分析极性较小的化合物,可以选择LLE法,这种方法根据相似相溶的原则进行分离提取,优点在于处理完的样品较干净,内源性物质去除彻底,缺点是消耗有机试剂的量较大,对操作人员及环境的污染也大<sup>[19,33]</sup>;SPE法在国外使用尤为广泛。它采用固相萃取小柱作为分离媒介,小柱中添加了不同填料的固定相,如以键合硅胶为基质的如C<sub>18</sub>、NH<sub>2</sub>、COOH、PSA、SAX等,使硅胶的表面活性大为降低,最大程度的降低了极性化合物的不可吸附和拖尾,使样品回收率和重现性得到保障。以高分子聚合物为基质的如PEP、HXN、PAX、PCX等,具有高纯度、高比表面的特点,以吸附型填料为固定相的如硅酸镁、氧化铝等,主要通过表面的极性吸附达到分离的目的<sup>[32,33]</sup>。SPE法适用于各种极性的化合物,样品处理过程中使用的设备简单,柱子活化便捷,基质效应低,缺点是价格昂贵。近年来又出现了96孔板的固相萃取小柱,可以批量处理样品,耗材少,耗时短,大大提高了工作效率。钟大放等<sup>[34]</sup>研究了苯丙哌林在人体内的羟基化代谢过程,尿样固相萃取后,用LCMS/MS法检测羟基化代谢产物,根据质谱断裂规律进一步推测结合型代谢产物的结构,结果在人尿中发现苯丙哌林的5种羟基化代谢产物和它们与内源性葡糖醛酸的结合物,与代谢产物对照品的LC和MS信息比较,确证了其中2种代谢产物的结构分别为4-羟基苯丙哌林和4-羟基苯丙哌林,苯丙哌林的羟基化代谢优先发生在芳环烷氧基对位,5种羟基化代谢产物在尿中主要以葡糖苷酸或硫酸酯结合物的形式存在<sup>[35]</sup>。

## 6 仪器使用注意事项

保持LC-MS/MS仪始终处于良好的运行状态是实现快速分析分离的首要条件,为此,在使用过程中应做到以下几点:第一,严格按照仪器的SOP进行操作;第二,液质分析分离时流速不能太大,若流速太大,使得被分析物在离子源内不易于离子化,影

响检测灵敏度,流速应控制在 0.1~1.0 mL/min 以下。谨慎使用流动相的添加剂,缓冲盐、酸或碱,必须易挥发,否则容易堵塞管路和源内的毛细管。第三,定期清洗离子源,尤其在使用沉淀蛋白法处理生物样品时,离子源很容易脏,定期清理可以提高灵敏度。清洗过程中一定要注意不要碰到喷雾针,以免使其弯曲而严重影响质谱响应。第四,去污剂、表面活性剂会产生离子抑制现象,表面活性剂产生的加合物和离子簇会干扰质谱数据,因此不要使用洗涤剂清洗玻璃器皿等容器,如果一定要用,建议超声清洗多次<sup>[36]</sup>。

## 7 展望

运用 LC-MS/MS 技术不仅可避免复杂烦琐地分离、纯化代谢产物的工作,而且可分离鉴定难以辨识的体内痕量代谢产物。近年来,液相色谱质谱联用技术取得了较大进展,以往仅为少数专家进行研究的方法逐步成为一种常规的应用技术,该技术对混合物的分析具有较高的灵敏度和选择性及广泛的适用性,可对药物及其体内代谢产物进行定性、定量分析,这使其在药物代谢研究中得到广泛应用。只要充分掌握 LC-MS/MS 技术,采用合适的样品制备方法,优化得到最佳的色谱分析条件和质谱分析条件,就可以消除基质效应对生物样品中药物及其代谢物定量测定的影响。这样 LC-MS/MS 法随着技术发展及普及,可快速、灵敏和可靠进行生物样品分析,不断为科学研究及实际应用提供更多地依据。

### 参考文献

- 1 Qu J, Wang Y M, Luo G A, et al. *Anal Chem*, 2002, 74 (9): 2034-2040
- 2 Qu J, Wang Y M, Luo G. *J Chromatogr A*, 2001, 919: 437-441
- 3 罗国安, 梁琼麟, 曲峻等. *广西师范大学学报*, 2003, 21 (2): 222-223
- 4 谢家树, 葛庆华. *药物分析杂志*, 2008, 28(8): 1386-1389
- 5 Dams R, Huestis M A, Lambert W E et al. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, 14(11): 1290-1294
- 6 Souverain S, Rudaz S, Veuthey J L. *J Chromatogr A*, 2004, 1058(1-2): 61-66
- 7 Matuszewski B K. *J Chromatogr B*, 2006, 830(2): 293-300
- 8 Bonfiglio R, King R C, Olah T V, et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1999, 13 (12): 1175-1185
- 9 Sheng Longsheng, Su Huanhua, Guo Danbin. *Chromatography-Mass Spectrometry*. Beijing: Chemical Industry Press, 2005, 130
- 10 李好枝. *体内药物分析*, 北京: 人民卫生出版社, 2006, 126
- 11 King R, Bonfio R, Fernandez-Metzler C, et al. *J Am Soc Mass Spectrum*, 2000, 11(11): 942-950
- 12 谢家树, 葛庆华. *药物分析杂志*, 2008, 28(8): 1386-1389
- 13 King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, et al. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11(11): 942-950
- 14 Kloepfer A, Quintana J B, Reemtsma T. *J Chromatogr A*, 2005, 1067(1-2): 153-160
- 15 Van De Steene J C, Mortier K A, Lumbert W E. *J Chromatogr A*, 2006, 1123(1): 71-81
- 16 谢智勇, 陈笑艳, 张逸凡等. *中国临床药理学杂志*, 2003, 19: 196-200
- 17 靳凤丹. *高师理科学刊*, 2009, 29(3): 57-60
- 18 Matuszewski B K, Constanzer M L, Chavez-Eng C M. *Anal Chem*, 1998, 70(5): 882-887
- 19 Muller C, Schafer P, Stortzel M, et al. *J Chromatogr B*, 2002, 773: 47-52
- 20 Wu Y, Farrell JT, Lynn K, et al. *Anal Chem*, 2003, 75 (3): 426-434
- 21 Ito S, Tsukada K. *J Chromatogr A*, 2002, 943: 39-46
- 22 Zhao Y, Wang L, Bao Y, et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(6): 971-981
- 23 Jemal M, Schuster A, Whigan DB. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(15): 1723-1734
- 24 Stokvis E, Rosing H, Beijnen J. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 401-407
- 25 Urpi-Sarda M, Jauregui O, Lamuela-Raventos R, et al. *Anal. Chem*, 2005, 77: 3149-3155
- 26 Van Hoof N, Courtheyn D, et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 2801-2808
- 27 Guo B, Li C, Deng Z, et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 2840-2848
- 28 Wang Z, Hop C A, Leung K H. *J Mass Spectrom*, 2000, 35(1): 71-78
- 29 El Mahjoub A, Staub C. *J Chromatogr B*, 2000, 742: 381-390
- 30 Swart R, Koivisto P, Markides KE. *J Chromatogr A*, 1998, 828: 209-218
- 31 齐美玲. *药物分析杂志*, 2005, 25(4): 476-479

- 32 Matuszewski B K, Constanzer M L, Chavez-Eng C M. *Anal Chem*, 1998, 70: 882-889
- 33 Erin Chambers, Diane M, Wagrowski-Diehl, et al. *J Chromatogr B*, 2007, 852: 22-34
- 34 钟大放, 陈笑艳, 杜宗敏等. *药学学报*, 2000, 35(12): 916-921
- 35 靳凤丹. *高师理科学刊*, 2009, 29(3): 57-60
- 36 美国应用生物系统中国公司. *Analyst 软件基本操作培训教程*, 2007

收稿日期: 2009-10-27

**Fast establishment of analytical methods for analysis of biological samples by LC-MS/MS.** *Zhang Juan-hong, Wang Rong, Xie Hua, Jia Zhengping, Zhang Qiang (Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou, 730050)*

In recent years, high performance liquid chromatography coupled-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) has become a powerful technique for the qualitative and quantitative analyses of drugs and their metabolites in biological fluids. However, how to establish better and faster methods for the analysis of biological samples by HPLC-MS/MS needs further study. This paper summarized several fast, sensitive and reliable methods, including optimization of MS operational condition, establishment of chromatographic condition, selection of internal standard, and preparation of samples. Experiences in the use and maintenance of instrument are discussed.