

体液的在线样品前处理技术及其小分子化合物的液相色谱-质谱分析

刘 敏, 赵利霞, 郭宝元, 林金明

(中国科学院生态环境研究中心 环境化学与生态毒理国家重点实验室, 北京 100085)

摘要 在线样品前处理液相色谱-质谱联用技术为体液中痕量小分子化合物提供了高灵敏度、高选择性和高通量的分析方法。该文以在线固相萃取柱为主线,总结了不同种类富集柱的特点及其近5年来在相关领域的应用,并简要介绍了在线液相色谱-质谱分析的流路系统。

关键词 在线固相萃取;液相色谱-质谱;小分子化合物;体液;综述

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2007)05-0646-08 栏目类别:样品预处理方法专栏

Development of On-Line Sample Preparation Coupled with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Analysis of Small Molecules in Biofluids

LIU Min, ZHAO Lixia, GUO Baoyuan, LIN Jin-Ming

(State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: On-line liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) is a highly sensitive, highly selective and high throughput method for the analysis of small molecules in biofluids. The developments, characterizations and applications of pre-column, on-line LC-MS method and its configuration in the recent five years are reviewed.

Key words: on-line solid phase extraction; liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); small molecules; biofluids; review

高效液相色谱-质谱(LC-MS)已经广泛应用于化学、环境、药物和生命科学等领域。对于体液中痕量有机小分子化合物的分析,由于其基质成分复杂,蛋白质等基质成分严重影响液相色谱-质谱定性和定量分析。常规的体液样品前处理方法主要包括蛋白质沉淀、液-液萃取等。这些方法消耗大量的有毒溶剂,都需要采用蒸发、定容等步骤,费时,并且易导致样品的损耗。近年来新发展起来的固相萃取、固相微萃取、膜渗透等方法节约了有机溶剂,但是仍需要繁琐的样品制备过程,无法满足高通量药物筛选的需要。随着新药开发大规模筛选的需要,体液的样品前处理方法成为分析的瓶颈。在线的样品前处理与高效液相色谱-质谱联用方法大大提高了样品的通量,使其近年来在体液分析领域得到了广泛的应用。本文针对体液中中小分子化合物的液相色谱-质谱在线检测方法,对在线样品前处理的一些新技术进行了综述。

1 在线固相萃取的流路

常规的体液在线液相色谱-质谱主要由两个色谱泵、一个自动进样器或进样阀、一个流通阀、富集柱、分析柱以及质谱检测器构成(如图1所示)。首先,萃取流动相将样品从自动进样器或进样阀中导出并导入预柱,清洗去除蛋白质等基质成分后,通过阀切换,分析流动相将样品从预柱转移至分析柱进行分离,进入质谱检测。该系统广泛应用于体液的在线分析^[1-7]。Barrett等^[1]建立了在线的LC-MS方法,实现了尿样中氢化可的松和6 β -羟基氢化可的松高灵敏度的分析,定量检测限分别为1和0.2 ng/mL,可用于服药患者体内的代谢监测。Preuss等^[3]以限制进入材料(restricted access media, RAM)柱为在线富集柱,利用LC-MS/MS直接测定尿样中的二-(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯的5种主要代谢产物。Suenami等^[8]用水作为载体,将经水

稀释 1 倍的血浆负载至 Oasis HLB 柱,以 10 mmol/L 甲酸铵 (pH 3.5)-乙腈 (体积比为 50:50) 为流动相,测定 11 种消炎药,回收率高于 76.2%,检测限达 0.002 5 ~ 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

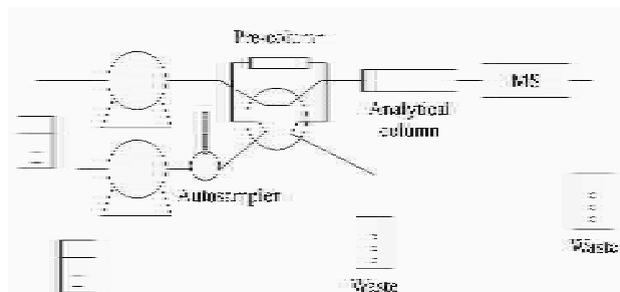


图 1 在线液相色谱-质谱分析流程图

Fig. 1 Scheme of on-line LC-MS

除了最经典的流路外,不少学者还在此基础上做了改进或重新设计了新的流路,并实现体液的在线 LC-MS/MS 分析。在线分析过程中,样品的转移步骤很关键,它要求快速地将样品完全转移至分析柱,并聚集于分析柱的柱头。为此,大多数方法采用高含量的有机溶剂作为分析流动相的起始点^[9-11]。但分析流动相起始点有机溶剂含量的提高不利于样品的分析,尤其是复杂体系样品的分析。Ye 等^[12,13]通过一个六通阀和一个八通阀,用有机溶剂含量高的洗脱剂将样品从富集柱上洗脱下来,然后在线稀释降低有机溶剂的含量后导入分析柱,实现峰聚焦,并加快分析速度。该体系分别应用于尿样中 9 种环境酚类化合物^[12]和对羟基苯甲酸烷基酯^[13]的测定。Xu 等^[14]在此基础上添加了一个储液环和一个流通阀,实现了类似的功能。Hua 等^[15]利用一个八通阀代替八通阀,同样通过阀位置的切

换,实现了血浆中奈非那韦及其代谢物的富集分离,并采用 MS/MS 反应离子监测模式定量,定量检测限小于 1 ng/mL。

为了避免质谱仪的污染,不少学者在原有的基础上添加了一个六通阀,只选择性地含有待测物的流出液导入质谱,其余导入废液^[16]。Amini 等^[17]在分析流动相输送泵与六通阀之间添加了一个进样阀,在线将内标物导入分离体系,考察低的回收率是由于基质效应还是不完全萃取造成的。为了更好地去除基质成分的干扰,许多方法采用双柱串联富集。双柱分别根据保留性质的差异选择性地保留分析物而去除基质干扰。串联的富集柱有:反相柱与离子交换柱^[18]、反相柱与 RAM 柱^[19]、RAM 柱与分子印迹聚合物(MIP)柱^[20]等,通过 2~3 个六通阀实现不同柱之间的切换。例如:Mullett 等^[20]利用 RAM 柱去除蛋白质等生物大分子基质,然后利用自制的 MIP 柱选择性地富集异搏定及其代谢产物,去除小分子。通过多维的在线富集,利用 LC-MSⁿ 可实现血浆、尿样和细胞等多种生物基质样品的分析,方法具有较好的线性和精密度。

此外,为了增加样品分析的通量,可采用双柱并联同时富集,典型的在线双柱富集 LC-MS 分析流程图如图 2 所示^[21]。作者通过比较发现,采用单根萃取柱萃取血浆中的睾丸激素和尼莫地平,并用 LC-MS/MS 分析,单次分析时间需要 4 min;而采用双贯流色谱(tubulent flow chromatography, TFC)富集柱、单分析柱系统,完成一次分析仅需 2.08 min,分析速度提高了 1 倍。Xia 等^[22]只利用一个八通阀,同样实现了双柱并联交替富集、单柱分析。

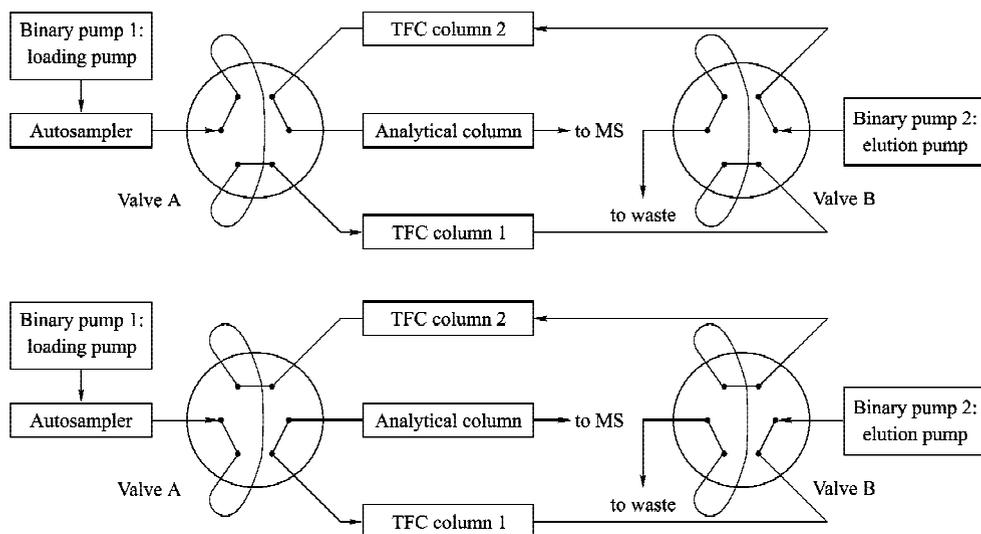


图 2 在线双柱富集 LC-MS 分析的流程图

Fig. 2 Scheme of on-line enrichment with two pre-columns coupled with LC-MS

2 富集柱

在线固相萃取柱是整个分析系统的核心组成部分。目前用于在线固相萃取液相色谱-质谱分析的富集柱主要有十八烷基键合硅胶柱、贯流色谱柱、限制进入材料柱、免疫柱、聚合物柱和离子交换柱等。我们以富集柱的分类为主线,介绍近年来在线固相萃取与液相色谱-质谱联用技术的进展。

2.1 十八烷基键合硅胶柱

十八烷基键合硅胶(C_{18})作为最常用的液相色谱填料,由于它的普适性,也是目前最常用的商品化

的离线固相萃取材料。在体液的在线液相色谱-质谱联用技术领域,它同样得到了广泛的应用,但近年来其应用有所减少。表 1 列举了 C_{18} 作为在线富集柱在体液在线液相色谱-质谱分析中的应用。分析基质包括尿样^[1, 23]、血清^[24]和血浆^[2, 25, 26]等,分析对象主要包括药物及其代谢产物(如氯氮平、氢化可的松等),还涉及污染物^[23]等各种化合物。Niederländer 等^[24]采用在线固相萃取液相色谱-质谱法分析血清中的氯氮平及其代谢产物,采用 150 mm 长的分析柱,单个样品分析时间只需 5 min;将分析柱的长度缩短至 30 mm,分析时间减至 3 min。

表 1 C_{18} 萃取柱在体液中分子化合物的在线 LC-MS 分析中的应用

Table 1 Applications of on-line LC-MS using C_{18} column as pre-column for the analysis of small molecules in biofluids

Analytes	Matrix	Mobile phase (extraction)	Mobile phase (separation)	Recovery/%	LOD ^a or LOQ ^b (ng/mL)	Ref.
6 β -Hydroxycortisol, cortisol	urine	2% NH ₄ OH/CH ₃ OH (90:10, v/v)	CH ₃ OH/H ₂ O (containing 0.1% formic acid (FA))	97-126	1 and 0.2 ^b	[1]
Talinolol	plasma	1% HAc and 5 mmol/L NH ₄ Ac (30:70, v/v)	CH ₃ OH/H ₂ O (containing 5 mmol/L NH ₄ Ac-1% HAc)	101-110	2.5 ^a	[2]
Phthalate esters	urine	H ₂ O	CH ₃ CN/H ₂ O (containing 0.1% HAc)	84.3-96.2	0.7-1.3 ^a 2.3-5.7 ^b	[23]
Clozapine and its metabolites	serum	CH ₃ OH/H ₂ O (15:85, v/v)	CH ₃ OH/25 mmol/L NH ₄ Ac (pH 4.5) (70:30, v/v)	62-107	0.15-0.3 ^a	[24]
Propranolol	plasma	5 mmol/L NH ₄ Ac (pH 7.0)	CH ₃ CN/5 mmol/L NH ₄ Ac (pH 7.0)	-	-	[25]
Sifuvirtide	plasma	CH ₃ CN/H ₂ O (containing 0.1% FA) (5:95, v/v)	CH ₃ CN/H ₂ O (containing 0.1% FA)	91.9-106	1.22 ^a	[26]

尽管它具有普遍的适用性,但人们在使用过程中发现, C_{18} 萃取柱的寿命非常有限,有时甚至需要每次更换新柱,否则连续进样三四次将导致柱压升高。Li 等^[25]详细考察了 C_{18} 萃取柱受进样体积的影响。结果表明在 5~50 μ L 范围内,心得安的响应值与进样体积呈线性关系;当进样体积为 100 μ L,连续进样 5 次以后,由于富集柱不可逆地吸附了血浆中的蛋白质,导致分析物的质谱响应急剧降低。

为了提高富集柱的使用寿命,往往增加额外的清洗过程。采用的清洗流动相有 2% 氢氧化铵和 10% 甲醇^[1]、水^[23]、15% 甲醇^[24]等。此外,可通过预先对样品进行蛋白质沉淀来提高富集柱的使用寿命^[2]。Bourgogne 等^[2]将 250 μ L 的血浆样品预先用 0.5 mol/L 高氯酸沉淀,再用 1 mol/L 的乙酸铵 500 μ L 调节至酸性,离心,取上层清液进样,并以 5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 1% 乙酸)为载液,将样品负载至捕集柱,用甲醇-水(含 1% 乙酸和 5 mmol/L 乙酸铵)体积比为 30:70)清洗,最后以甲醇-5 mmol/L 乙酸铵(含 1% 乙酸)为分析流动相将样品转移至分析柱进行分离检测。这样操作单根固相萃取柱可

重复使用超过 28 次。

2.2 贯流色谱柱

1997 年,Quinn 和 Takarewski^[27]开发了一种大粒径填料,其允许高流速的分析,由此发展起来的新的色谱分析方法被称之为贯流色谱。该类萃取柱填料的粒径为 30~50 μ m。由于它的颗粒大,产生的柱压小,因而可增大样品负载的流速,通常采用的流速范围为 3~5 mL/min。样品高速通过富集柱增强了富集柱对蛋白质的去除能力。目前商品化的 TFC 柱主要有两种类型:一种是以硅胶为基质,表面键合经典的烷基链(如 C_2 、 C_8 或 C_{18})、苯基、混合型极性/非极性相;另一种是以聚合物为基质,如 Waters 公司推出的 Oasis HLB 柱,以二乙烯基苯基-N-乙烯基吡咯酮共聚物作为填料。表 2 给出了贯流色谱柱在体液在线液相色谱-质谱分析中的应用。它已广泛应用于尿样^[16, 28, 39]、血清^[38]、血浆^[8, 9, 15, 37]以及其他生物基质(如脑浆^[21]和透析液^[28]等)的分析。

与普通的 C_{18} 富集柱相比,TFC 柱在样品的制备过程中存在两个明显的优点。

表 2 贯流色谱柱在体液中分子化合物的在线 LC-MS 分析中的应用
Table 2 Applications of on-line LC-MS using turbulent flow chromatographic column as pre-column for the analysis of small molecules in biofluids

Analytes	Matrix	Mobile phase (extraction)	Mobile phase (separation)	Recovery/%	LOD ^a or LOQ ^b (ng/mL)	Ref.
16 non-steroidal anti-inflammatory drugs	plasma	H ₂ O	10 mmol/L HCOONH ₄ (pH 3.5)/CH ₃ CN(50:50, v/v)	72.6 - 96.1	2.5 - 20 ^a	[8]
Methoxyamine	plasma	H ₂ O	CH ₃ CN/H ₂ O(95:5, v/v)	90.1 - 94.7	0.150 ^a 0.500 ^b	[9]
Cyclosporin A, tacrolimus, sirolimus	blood	CH ₃ OH/H ₂ O (10:90, v/v)	CH ₃ OH/H ₂ O (containing 10 mmol/L NH ₄ Ac + 0.1% HAc) (97:3, v/v)	93 - 97	0.05 - 1 ^a 0.2 - 4.5 ^b	[10]
PPAR α/γ -agonist	plasma	0.3% FA	CH ₃ CN/0.1% FA	92.5 - 105	4 ^b	[14]
Nelfinavir and its metabolites	plasma	CH ₃ OH/H ₂ O (5:95)	CH ₃ CN/0.05% HAc (60:40, v/v)	97.2 - 113	<1 ^b	[15]
Flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam	urine	1.5% NH ₄ OH	CH ₃ CN/H ₂ O	94.8 - 101	1 - 3 ^a	[16]
R/S-propranolol	plasma	10 mmol/L NH ₄ Ac	0.05% CF ₃ COONH ₄ /CH ₃ OH (75:25, v/v)	84.5 - 106	0.5 ^a 2 ^b	[22]
α/β Antagonist	urine, dialysate	CH ₃ OH/H ₂ O containing 0.05% FA (10:90, v/v)	CH ₃ OH/H ₂ O containing 0.05% FA (90:10, v/v)	87.8 - 105.2	2.0.1 ^b	[28]
Verapamil, Indiplon and compounds I - VI	plasma	CH ₃ CN/0.1% FA (10:90, v/v)	CH ₃ CN/0.1% FA	92.7 - 105.3	1.95 ^b	[29]
Active drug, prodrug	plasma, liver S9 fraction	0.1% FA	CH ₃ CN/0.1% FA	-	-	[30]
Compounds	plasma	1% FA	CH ₃ CN	30 - 75	5	[31]
Flumazenil	microsome	5 mmol/L FA	CH ₃ CN/H ₂ O (5 mmol/L FA)	96	1 nmol/L	[32]
Dextromethorphan and its two metabolites	plasma	CH ₃ OH/0.05% FA (5:95, v/v)	CH ₃ OH/0.05% FA	82.6 - 103	0.5 ^b	[37]
Pioglitazone	serum	5 mmol/L NH ₄ Ac (pH 4.0)	5 mmol/L NH ₄ Ac/CH ₃ CN (50:50, v/v)	85.7 - 121	9 ^b	[38]
Piritramide	urine	H ₂ O/CH ₃ CN/FA (98:2:0.1, v/v)	CH ₃ CN/0.1% FA	92.4 - 102	0.05 ^a	[39]
Docetaxel	plasma	H ₂ O	CH ₃ OH/H ₂ O (95:5, v/v)	86.1 - 94.7	1.00 ^b	[40]
Immuno-suppressants	blood	CH ₃ OH/H ₂ O (50:50, v/v)	CH ₃ OH/H ₂ O (containing 10 mmol/L NH ₄ Ac + 0.1% HAc) (97:3, v/v)	88 - 103	0.1 - 1.3 ^a 1.0 - 10 ^b	[41]
Fenfluramine, temazepam, oxazepam, tamoxifen	plasma	0.1% FA	CH ₃ CN/0.1% HAc	-	1 - 2.5 nmol/L	[42]

其一,可采用单一的流动相以高流速负载并清洗样品,基本不需要额外的清洗程序,简化了在线样品处理过程,加快了分析速度,萃取和清洗时间缩短至 1 min^[9,15,21,34,36]。Gjerde 等^[34]分析血清中的它莫西芬及其代谢产物。他们以 4 mL/min 的 0.05% 甲酸(pH 2.8)负载样品,样品萃取、清洗只需 1 min,整个分析时间为 6 min,全天可分析 200 份样品。Ynddal 等^[37]以甲醇-0.05% 甲酸(体积比为 5:95)作萃取载液,以 5.0 mL/min 的流速负载并清洗样品 0.5 min,以甲醇-0.05% 甲酸混合液梯度洗脱分离,MS 测定美沙芬及其代谢物,回收率为 82.6% ~ 103%,检测限为 0.5 ng/mL。

其二,贯流色谱采用高流速萃取,更好地去除了基质中的蛋白质等干扰成分,使柱寿命增加。Yang

等^[9]在 Oasis[®] HLB 富集柱前增加了在线的过滤装置(减少基质中的颗粒物进入富集柱),并且每次使用后富集柱保存于 50% 的乙醇溶液中,使单根富集柱可完成 300 次的血浆分析(单次进样 10 μ L)。Ceglareka 等^[10]取 50 μ L 加标血样,用 1.5 mL 体积比为 4:1 的甲醇-50 g/L 硫酸锌稀释、离心后,取上层清液进样 25 μ L,建立了血样中免疫抑制剂环孢霉素 A、他克莫司、西罗莫司的在线 TFC-LC-MS 分析方法。采用该方法每日可分析约 80 份样品。每天分析完样品后用甲醇分别以 5 mL/min 和 0.6 mL/min 的流速清洗萃取柱和分析柱。该系统中的贯流色谱柱分析 800 份样品后性能不变;而分析柱可稳定分析超过 2 000 份样品。

采用贯流色谱柱富集允许高流速负载样品,这

有利于去除样品中的蛋白质等成分,且不会导致柱压升高。但是如果作为分析柱,贯流色谱柱的大颗粒填料降低了色谱性能,使柱效下降。而以整体柱作为分析柱,可在高流速下使用并保持高柱效。Zang 等^[29]以 Phenomenex 公司提供的极性功能化的聚合物作为萃取柱(比表面积大于 $800 \text{ m}^2/\text{g}$,孔径 85 nm)选取短的整体柱 RP-18e ($4.6 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$)作为分析柱,采用 $4 \text{ mL}/\text{min}$ 流速负载样品、 $3 \text{ mL}/\text{min}$ 流速洗脱样品并进入整体柱进行分离,整个分析过程仅用时 2.8 min 。完成 300 份样品分析后萃取柱仍保持良好的色谱性能。另外,Zeng 等^[42]也将两者有机结合,测定了血浆中的氟苯丙胺、羟基安定、去甲羟基安定、三苯氧胺等碱性药物,整个分析过程仅 1.2 min ,连续 10 h 分析样品 407 份,系统柱压升高不到 30%。

各种商品化的 TFC 柱的性能有所差异,对不同极性的化合物具有不同的萃取能力。Cyclone HTLC 柱($60 \mu\text{m}$ 聚合物颗粒)适合于 $\log P > 0$ 的中等亲水至疏水性化合物的萃取;而 Polar Plus 柱(涂覆的 $50 \mu\text{m}$ 硅胶颗粒)更适用于萃取亲水性的化合物($\log P < 0$)。因而,可根据化合物的亲脂性质来选择富集柱的类型,加快样品分析方法的建立^[31,39]。

2.3 限制进入材料柱

限制进入材料的概念是 1991 年由 Desilets 等^[43]首先提出的。该类材料的开发旨在建立体液的直接进样在线分析方法。这类材料具有特殊的结构:外表面涂覆各种亲水性的基团(如甲基纤维素、二醇基等),利用尺寸排阻原理,使蛋白质等生物大分子不被保留,排入废液中;内表面键合有各种功能团,包括常规的具有反相色谱性能的烷基链(如 C_4 、 C_8 、 C_{18} 等)以及离子交换基团。小分子分析物渗透进入内表面后由于疏水作用而被保留,从而达到去除生物大分子等基质成分,保留分析物的目的。其结构示意图如图 3 所示。

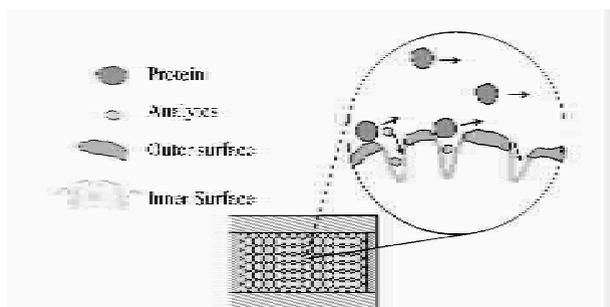


图 3 RAM 材料的结构示意图

Fig. 3 Configuration of the pre-column packed with restricted access media

到目前为止,未见自制的相关材料的报道,人们所使用的限制进入材料柱主要来源于不同厂家的商品化产品,主要的品牌有 ADS、BioTrap、MAYI 和 Capcell MF。尽管各厂家的 RAM 柱的内外表面修饰功能基团千差万别,但主要的差别在于对外表面的修饰。

烷基二醇硅胶(alkyl-diol silica, ADS)是由 Boos 等^[44]制备的。目前最流行的 RAM 柱的外表面修饰有二醇基。Christiaens 等^[11]以 RPC-4 ADS 作为富集柱,采用直接进样在线 LC-MS/MS 方法分析了血浆中的去乙酰环丙氯地孕酮醋酸酯和甲孕酮醋酸酯。

BioTrap 是由 Hermansson 和 Grahn 于 1994 年研究开发的产品,于次年商品化。他们将蛋白质 α_1 -酸糖蛋白涂覆于硅胶表面上。目前,他们推出了一款新的商品化柱 BioTrap MS。该柱用疏水性的高聚物基质(适用的 pH 范围为 $2 \sim 10$)代替硅胶(适用的 pH 范围为 $2.5 \sim 7.5$),从而拓宽了应用范围。Friedrich 等^[5]以选择反应离子扫描模式,建立了血浆和尿中双氢麦角隐亭的在线 LC-MS/MS 分析方法。该方法的线性范围为 $25 \sim 1000 \text{ pg}/\text{mL}$,加标血浆样品的回收率为 99%,批内和批间的精密程度分别为 $1.7\% \sim 13.8\%$ 和 $5.0\% \sim 9.1\%$,定量检测限为 $25 \text{ pg}/\text{mL}$ 。

MAYI 是由 Shimadzu 公司推出的 RAM 柱,其外表面涂覆有亲水性的甲基纤维素。Kawano 等^[45]利用 MAYI-ODS 与 LC-MS 结合,建立了血浆中多种药物(如心得安、利多卡因、二丁卡因等)的直接进样分析方法,回收率大于 90%。Capcell Pak MF 是由 Kanda 等^[46]于 1994 年提出的。该材料不同于其他的 RAM 材料,它的内外表面均涂覆有亲水性的聚氧乙烯和疏水性的聚苯乙烯、苯基或 C_8 。该富集材料多见用于在线液相色谱分析体液中的小分子药物,而有关 LC-MS 的报道非常有限。Hsieh 等^[47,48]利用 Capcell Pak MF C_8 建立了血浆样品中多种药物的分析方法,该法具有很好的回收率(高于 90%)。此外,一些厂家还推出了相应的具有离子交换功能的 RAM 柱。该柱主要是内表面修饰有离子交换功能基团,例如 ADS、MAYI 和 Capcell Pak MF 系列。Kawano 等^[7]和 Sakaguchi 等^[19]分别采用 MAYI-SCX 作为富集柱,分析测定了血浆、胆汁等生物样品中的离子型药物。表 3 给出了以 RAM 为萃取柱建立的在线 LC-MS 体液分析方法。

与前两者相比, RAM 柱更适用于体液的直接进样分析。它广泛应用于血浆^[4,18,52]、血清^[50,51]、尿液^[5,6]和胆汁^[19]等样品的直接进样分析。Papp

表 3 RAM 萃取柱在体液中 小分子化合物的在线 LC-MS 分析中的应用

Table 3 Applications of on-line LC-MS for the analysis of small molecules in biofluids using RAM as pre-column

Analytes	Matrix	Mobile phase (extraction)	Mobile phase (separation)	Recovery/%	LOD ^a or LOQ ^b / (ng/mL)	Ref.
Five major urinary of di-(2-ethylhexyl) phthalate	urine	CH ₃ OH/1% HAc (5:95 , v/v)	CH ₃ CN/ CH ₃ OH/1% HAc	91.2 - 113	0.25 ^a	[3]
Rofecoxib	plasma	CH ₃ CN/H ₂ O (5:95 , v/v)	CH ₃ OH/H ₂ O (1% HAc X 50:50 , v/v)	75.8 - 86.3	40 ^b	[4]
Dihydroergocryptine	Plasma , urine	10 mmol/L NH ₄ HCO ₃ - 2-propanol (90:10 , v/v)	CH ₃ OH/2-propanol/ 10 mmol/L FA	99	0.025 ^b	[5]
Primary and secondary phthalate metabolites	urine	CH ₃ OH/1% HAc (10:90 , v/v)	CH ₃ CN/1% HAc	84.6 - 106	0.25 - 1 ^a 0.5 - 2.0 ^b	[6]
Basic polar drugs	plasma	0.1% HAc	CH ₃ CN/50 mmol/L NH ₄ Ac	77.8 - 115	0.7 ^a 2 ^b	[7]
Cyproterone acetate	plasma	CH ₃ CN/H ₂ O/FA , (10:90:0.1 , v/v/v , pH 4.0)	CH ₃ OH/H ₂ O/FA (90:10:0.1 , v/v/v)	98 - 101	0.12 ^a 0.30 ^b	[11]
Phenols	urine	CH ₃ OH/H ₂ O (20:8 , v/v)	CH ₃ OH/H ₂ O	65 - 100	0.1 - 2 ^a	[12]
Parabens	urine	CH ₃ OH/H ₂ O (20:80 , v/v)	CH ₃ OH/H ₂ O	80 - 100	<0.2 ^a	[13]
Eight organo- phosphorus triesters	plasma	1 mmol/L FA	CH ₃ OH/H ₂ O (containing 1 mmol/L FA)	60 - 92	0.2 - 1.8 ^a	[17]
Therapeutic agent	plasma	H ₂ O/CH ₃ OH (95:5 , v/v)	CH ₃ CN/H ₂ O (containing 0.1% FA)	93 - 110	1 ^b	[18]
8-Hydroxyquinoline and its glucuronide , propranolol	bile	0.05% HAc/CH ₃ CN (0.1% HAc)	CH ₃ CN/0.6% triethylamine	93.1 - 109		[19]
Verapamil and its metabolites	cell cultures , urine and plasma	0.01 mol/L NH ₄ Ac (pH 6)/CH ₃ CN (95:5 , v/v)	CH ₃ CN/0.01 mol/L NH ₄ Ac (pH 3 X 50:50 , v/v)	65 - 100	5 ^a	[20]
Metoprolol , propranolol , lidocaine , dibucaine , bupivacaine	plasma	CH ₃ CN/10 mmol/L NH ₄ Ac (5:95 , v/v)	CH ₃ CN/H ₂ O	94.0 - 108	2.4 - 5.5 ^b	[45]
Donepezil	plasma	H ₂ O/CH ₃ CN/NH ₄ Ac , (50:50:0.385 , v/v/w)	H ₂ O/CH ₃ CN (containing 0.1% TFA)	90.4 - 103	0.001 ^a 0.01 ^b	[49]
Voriconazole	serum	0.1% FA	CH ₃ CN/0.1% FA (50:50 , v/v)	94.2 - 119	30 ^a 50 ^b	[50]
Bisphenol A , 4-octylphenol	serum	CH ₃ OH/H ₂ O (containing 10 mmol/L NH ₄ Ac) (5:95 , v/v)	CH ₃ OH/H ₂ O	80 - 101	0.1 ^b 0.5 ^b	[51]

等^[18]以 C₁₈RAM-ADS 为萃取柱,采用 LC-MS 方法直接分析血浆中的小分子药物。该方法通过紫外检测器实时监测优化样品的负载速度和进样体积,在 1 ~ 500 ng/mL 的范围内,回收率达 93% ~ 110% 精密度小于 5%。与传统的蛋白质沉淀方法对照,发现两种方法的相关性为 0.993。Koch 等^[6]利用在线的 LC-MS/MS 建立了尿样中邻苯二甲酸酯(ME-HP)代谢物的分析方法,定量限为 0.5 ~ 2.0 μg/L。该法用于实际非职业暴露人体尿样中污染物含量水平的测定,发现 5-羟基-MEHP 的浓度水平为 0.59 ~ 124 μg/L 5-氧-MEHP 和 MEHP 的含量分别小于 73.0 和 41.1 μg/L,且在每份尿样中都检测到不同浓度的其他短链单酯代谢产物苯基邻苯二甲酸酯(monobenzylphthalate, MBzP)、*n*-丁基邻苯基二甲

酸酯(mono-*n*-butylphthalate, MnBuP)、乙基邻苯二甲酸酯(monoethylphthalate, MEP),其质量浓度平均值分别为 36.5, 7.19 和 11.0 μg/L。Liu 等^[51]利用 MAYI-ODS 添加旁路稀释流动相,建立了血清中双酚 A 和 4-辛基酚的在线 LC-MS 分析方法,回收率为 80% ~ 110%,检测限低达 ng/mL 水平。该方法已用于实际样品的分析。

此外, RAM 的特殊结构使蛋白质的去除效果得到了改善,柱寿命增加。据报道 RAM 柱能对 80 ~ 100 mL 的血浆样品进行分析^[52]。Christiaens 等^[11]以 RPC-4 ADS 作为富集柱,采用直接进样在线 LC-MS/MS 方法分析了血浆中去乙酰环丙氯地孕酮醋酸酯和甲孕酮醋酸酯,并对富集柱的寿命做了细致的考察。以 pH 4.0 的乙腈-水-甲酸(体积比

为 10:90:0.1)混合液为负载流动相,以水-甲醇-甲酸(体积比为 10:90:0.1)为分析流动相进行分析,方法的回收率为(99.4 ± 1.4)%,检测限为 0.12 ng/mL。该系统可进行 1 000 次的血浆分析(每次进样 30 μL)。Vintiloiu 等^[4]将 ADS RP-18 富集柱与 C₁₈整体柱结合实现了样品的快速分析,单个样品分析只需 5 min。重复实验发现,单根 RAM 柱的寿命超过 200 次进样分析(单次进样 50 μL 血浆)。要维持富集柱和分析柱优越的色谱性能,有几个关键的因素要注意:首先,血浆样品必须经过离心;其次,清洗过程要添加一定的有机改性剂;最后,建议在进样器与富集柱之间添加在线的过滤器以免筛板和管路堵塞。

2.4 其他类型的富集柱

除了以上几大类富集柱可用于生物样品直接进样分析外,不少学者还探索其他类型的吸附材料,例如改性硅胶柱(疏水短链硅胶柱(如 C₄、C₈)^[53-54]、氨基柱^[55]、氰基柱^[56]、巯基柱^[57]等)、聚合物柱^[58-60]、整体柱^[61-62]和免疫柱^[63]等。Heinig 等^[56]因甲福明二甲双胍具有强极性,在疏水反相色谱柱上不被保留而采用极性氰基柱,以高含量有机溶剂为流动相,提供正相色谱保留机理,增强其在氰基柱上的保留,采用乙腈-水(体积比为 95:5)作为样品的载液,以乙腈-水(含 10 mmol/L 乙酸铵和 1% 甲酸)体积比为 80:20)为洗脱流动相,实现样品的快速分析,单次分析时间不到 1 min。Raices 等^[59]采用聚二乙烯苯吸附剂,在线 LC-MS/MS 测定血清中的司他夫定,固相萃取柱依次用 0.5 mL 甲醇和水活化,在水的载流作用下,100 μL 血清直接进样,24 h 可测定样品 300 份。Xu 等^[61]将乙腈沉淀后的血浆上层清液负载到整体柱,以 Phenomenex Luna C₁₈(2)柱(2.0 mm × 150 mm)为分析柱,测定了血浆中的安普那韦(APV)和施贵宝。他们以 4 mL/min 高速负载并清洗样品 0.7 min,然后导入分析柱分离,整个分析过程只需 4 min。他们还详细考察了方法在不同浓度水平的准确度和精密度,发现在所有的浓度范围相对标准偏差均小于 10%,表明方法具有良好的重现性。同时他们还发现,分析样品达 450 份柱压仍没有明显的变化。Lua 等^[63]利用免疫柱不同 pH 值的识别差异,选择性地在在线富集尿样中的 D-脱氧麻黄碱,以 50 mmol/L 乙酸铵(pH 7.0)为样品载液在中性条件下捕集 L-和 D-脱氧麻黄碱,而在 pH 5.6 和 3.5 条件下分别释放 L-和 D-脱氧麻黄碱,建立的尿样中 D-脱氧麻黄碱分析方法的线性范围为 150 ~ 1 050 ng/mL,检测限达 18 ng/mL。

3 展望

在线样品前处理液相色谱-质谱联用技术在液中小分子化合物的定性和定量分析中发挥了巨大的作用。然而,目前的富集柱主要基于疏水作用保留分析物,随着痕量分析的发展,将会对在线富集材料的选择性提出更高的要求。另外,通过多柱和阀之间的切换,实现更高通量的分析是进一步拓宽实际应用的需要。随着药代动力学的发展,未知物的定性分析势必会进一步加强。

参考文献:

- [1] Barrett Y C, Akinsanya B, Chang S Y, Vesterqvist O. *J Chromatogr B*, 2005, 821:159
- [2] Bourgogne E, Grivet C, Hopfgartner G. *J Chromatogr B*, 2005, 820:103
- [3] Preuss R, Koch H M, Angerer J. *J Chromatogr B*, 2005, 816:269
- [4] Vintiloiu A, Mullett W M, Papp R, Lubd D, Kwong E. *J Chromatogr A*, 2005, 1082:150
- [5] Friedrich G, Appel K, Rose T, Wangemann M, Althaus M, Rissler K. *J Chromatogr B*, 2004, 808:131
- [6] Koch H M, Gonzalez-Reche L M, Angerer J. *J Chromatogr B*, 2003, 784:169
- [7] Kawano S I, Takahashi M, Hine T, Yamamoto E, Asakawa N. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19:2827
- [8] Suenami K, Lim L W, Takeuchi T, Sasajima Y, Sato K, Takekoshi Y, Kanno S. *J Sep Sci*, 2006, 29:2725
- [9] Yang S M, Liu L L, Gerson S L, Xu Y. *J Chromatogr B*, 2003, 795:295
- [10] Ceglareka U, Lembcke J, Fiedler G M, Wernera M, Witzigmann H, Haussb J P, Thiery J. *Clin Chim Acta*, 2004, 346:181
- [11] Christiaens B, Fillet M, Chiap P, Rbeida O, Ceccato A, Strel B, Graevic J D, Crommen J, Hubert P. *J Chromatogr A*, 2004, 1056:105
- [12] Ye X Y, Kuklenyik Z, Needham L L, Calafat A M. *Anal Chem*, 2005, 77:5407
- [13] Ye X Y, Kuklenyik Z, Bishop A M, Needham L L, Calafat A M. *J Chromatogr B*, 2006, 844:53
- [14] Xu X H, Yan K X, Song H C, Lo M W. *J Chromatogr B*, 2005, 814:29
- [15] Hua Y S, Fan-Havard P, Chan K K. *J Chromatogr B*, 2004, 809:1
- [16] Fuh M R, Lin S W, Chen L L, Lin T Y. *Talanta*, 2007, 72:1329
- [17] Amini N, Crescenzi C. *J Chromatogr B*, 2003, 795:245
- [18] Papp R, Mullett W M, Kwong E. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 36:457
- [19] Sakaguchi T, Yamamoto E, Kushida I, Kajima T, Asakawa N. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40:345
- [20] Mullett W M, Walles M, Levsen K, Borlak J, Pawliszyn J. *J Chromatogr B*, 2004, 801:297
- [21] Ong V S, Cook K L, Kosara C M, Brubaker W F. *Int J Mass Spectrom*, 2004, 238:139
- [22] Xia Y Q, Bakhtiar R, Franklin R B. *J Chromatogr B*, 2003, 788:317

- [23] Kato K , Shoda S , Takahashi M , Doi N , Yoshimura Y , Nakazawa H. *J Chromatogr B* , 2003 , 788 : 407
- [24] Niederländer H A G , Koster E H M , Hilhorst M J , Metting H J , Eilders M , Ooms B , Jong G J. *J Chromatogr B* , 2006 , 834 : 98
- [25] Li M , Alnouti Y , Leverage R , Bi H , Gusev A I. *J Chromatogr B* , 2005 , 825 : 152
- [26] Dai S J , Song H F , Dou G F , Qian X H , Zhang Y J , Cai Y , Liu X W , Tang Z M. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 2005 , 19 : 1 273
- [27] Quinn H M , Takarewski J J. *International Patent* , WO97/16724 , 1997
- [28] Zeng W , Wang A Q , Fisher A L , Musson D G. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 2003 , 17 : 2 475
- [29] Zang X , Luo R , Song N , Chen T K , Bozigian H. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 2005 , 19 : 3 259
- [30] Lai F , Khojasteh-Bakht S C. *J Chromatogr B* , 2005 , 814 : 225
- [31] Sadagopan N , Pabst B , Cohen L. *J Chromatogr B* , 2005 , 820 : 59
- [32] Lavén M , Markides K , Långström B. *J Chromatogr B* , 2004 , 806 : 119
- [33] Mao Y , Huang M Q , Xia Y Q , Jemal M. *J Pharm Biomed Anal* , 2007 , 43 : 1 808
- [34] Gjerde J , Kisang E R , Hauglid M , Holm P I , Mellgren G , Lien E A. *J Chromatogr A* , 2005 , 1 082 : 6
- [35] Zhang J , Musson D G. *J Chromatogr B* , 2006 , 843 : 47
- [36] Xu Y , Grem J L. *J Chromatogr B* , 2003 , 783 : 273
- [37] Ynddal L , Hansen S H. *J Chromatogr A* , 2003 , 1 020 : 59
- [38] Xue Y J , Turner K C , Meeker J B , Pursley J , Arnold M , Unger S. *J Chromatogr B* , 2003 , 795 : 215
- [39] Kahlich R , Gleiter C H , Laufer S , Kammerer B. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 2006 , 20 : 275
- [40] Grozav A G , Hutson T E , Zhou X , Bukowski R M , Ganapathi R , Xu Y. *J Pharm Biomed Anal* , 2004 , 36 : 125
- [41] Koal T , Deters M , Casetta B , Kaeffer V. *J Chromatogr B* , 2004 , 805 : 215
- [42] Zeng H , Deng Y Z , Wu J T. *J Chromatogr B* , 2003 , 788 : 331
- [43] Desilets C P , Rounds M A , Regnier F E. *J Chromatogr* , 1991 , 544 : 25
- [44] Rudolphi A , Vielhauer S , Boos K S , Seidel D , Bathge I M , Berger H. *J Pharm Biomed Anal* , 1995 , 13 : 615
- [45] Kawano S I , Murakita H , Yamamoto E , Asakawa N. *J Chromatogr B* , 2003 , 792 : 49
- [46] Kanda T , Kutsuna H , Ohtsu Y , Yamaguchi M. *J Chromatogr A* , 1994 , 672 : 51
- [47] Hsieh Y S , Bryant M S , Brisson J M , Ng K , Korfmacher W A. *J Chromatogr B* , 2002 , 767 : 353
- [48] Hsieh Y S , Brisson J M , Ng K , Korfmacher W A. *J Pharm Biomed Anal* , 2002 , 27 : 285
- [49] Asakawa Y , Ozawa C , Osada K , Kaneko S , Asakawa N. *J Pharm Biomed Anal* , 2007 , 43 : 683
- [50] Egle H , Trittler R , König A , Kümmerer K. *J Chromatogr B* , 2005 , 814 : 361
- [51] Liu M , Hashi Y , Pan F Y , Yao J G , Song G Q , Lin J M. *J Chromatogr A* , 2006 , 1 133 : 142
- [52] Baeyens W R G , Weken G , Haustraete J , Aboul-Enein H Y , Corveleyn S , Remon J P , Garcia-Campana A M , Deprez P. *J Chromatogr A* , 2000 , 871 : 153
- [53] Ng K Y , Zhou H Y , Zhang Y L , Hybertson B , Randolph T , Christians U. *J Chromatogr B* , 2007 , 847 , 188
- [54] Okamoto M , Yamashita K , Nakai K. *J Pharm Biomed Anal* , 2006 , 41 : 707
- [55] Chao M R , Wang C J , Yang H H , Chang L W , Hu C W. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 2005 , 19 : 2 427
- [56] Heinig K , Bucheli F. *J Pharm Biomed Anal* , 2004 , 34 : 1 005
- [57] Calderoli S , Colombo E , Frigerio E , James C A , Sibum M. *J Pharm Biomed Anal* , 2003 , 32 : 601
- [58] Estrela R C E , Salvadori M C , Suarez-Kurtz G. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 2004 , 18 : 1 147
- [59] Raices R S L , Salvadori M C , Estrela R C E , Aquino Neto F R , Suarez-Kurtz G. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 2003 , 17 : 1 611
- [60] Yang Y J , Lee J , Choi M H , Chung B C. *Biomed Chromatogr* , 2003 , 17 : 219
- [61] Xu R N , Fan L M , Kim G E , El-Shourbagy T A. *J Pharm Biomed Anal* , 2006 , 40 : 728
- [62] Kato K , Silva M J , Needham L L , Calafat A M. *Anal Chem* , 2005 , 77 : 2 985
- [63] Lua A C , Sutono Y , Chou T Y. *Anal Chim Acta* , 2006 , 576 : 50