Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用Oasis PRiME MCX开发简便、快速的SPE方案用于萃取碱性分析物并有效去除磷脂

Bonnie A. Alden、Kenneth Berthelette、Jon Finch、Donna Osterman、Thomas Swann、Thomas H. Walter
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 采用混合模式RP/SCX SPE提高血浆中磷脂的去除率
- 降低碱性分析物LC-MS分析中的基质效应
- 减少污染，有效延长LC-MS系统运行时间和色谱柱使用寿命

沃特世解决方案

Oasis® PRiME MCX小柱和96孔板

Oasis MCX小柱和96孔板

ACQUITY® UPLC® BEH C_8和C_{18}色谱柱

ACQUITY UPLC I-Class系统

ACQUITY UPLC PDA检测器

Xevo® TQ-S质谱仪

Empower® 3 CDS软件

MassLynx®软件(4.1版)

关键词

SPE，SPE 方法开发，Oasis PRiME MCX，磷脂去除，血浆，碱性药物，LC-MS/MS，阳离子交换

简介

液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)技术是生物样品的定量分析中应用最广泛的技术之一。生物样品中的内源性磷脂增加了分析难度，磷脂可引起显著的基质效应[1]，使得分析物MS信号受到抑制或增强。如果目标峰与磷脂洗脱的区域重叠，会导致分析物峰面积变化，进而使得最终报告的分析物浓度发生变化。磷脂还可能牢牢附着到色谱柱上[2]，它们在色谱柱上的积聚可能会改变分析物的选择性和保留性。最终，色谱柱中的磷脂达到饱和，过量的磷脂将逐渐流出色谱柱，这样无论分析物何时洗脱流出都会受到影响，从而引发基质效应。分析人员为了缩短LC-MS/MS运行时间并最大限度提高灵敏度，往往会选择较短的窄径色谱柱，而这种色谱柱最易出现上述问题。此外，如果磷脂在接口处积聚，还可能污染LC-MS系统。

为了解决这些问题，人们已经开发出多种样品制备方法。使用乙腈等溶剂进行蛋白沉淀是常用的方法之一，但该方法无法有效去除磷脂[3]。固相萃取(SPE)技术比蛋白沉淀法更有效，但其去除磷脂的效果不尽相同[2,3,4]。分析碱性化合物时，混合模式反相/强阳离子交换(RP/SCX) SPE吸附剂能够选择性地保留并浓缩这类分析物。选择合适的上样和清洗条件是成功去除磷脂，同时保持分析物较高回收率的关键。在本应用纪要中，我们使用Oasis PRiME MCX开发了一套简便、快速的SPE制备方案。Oasis PRiME MCX以Oasis MCX技术为基础，是沃特世推出的全新混合模式RP/SCX样品制备系列产品。

实验

样品1：磷脂酰胆碱(PC)标准品

将L-α-磷脂酰胆碱(100 mg, Sigma #P3556)溶于甲醇(1 mL)，然后加入乙腈(80 mL)和水(19 mL)。略微加热混合物以获得均相溶液。采用本文介绍的小柱(1 cc/30 mg) SPE净化方案处理该溶液。为避免PC发生水解，在“洗脱”步骤得到的洗脱液中，加入35 µL 98%甲酸中和的氨水。此外，“上样”、“水性溶液清洗”和“有机溶剂清洗”步骤得到的流出液中也分别加入35 µL 98%甲酸，保持体积相同。进样前，涡旋混合收集的洗脱液。

仪器:	配备PDA检测器的 ACQUITY UPLC I-Class系统
数据管理:	Empower 3 CDS

LC方法条件

色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C_8 1.7 µm, 2.1 × 50 mm (部件号：186002877)
柱温:	60 °C
进样体积:	1.4 µL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	100%水
流动相B:	100%乙腈
梯度:	0.1%流动相B保持0.5 min 流动相B在6.5 min内从0.1%增至60% 流动相B在1 min内从60%增至95% 95%流动相B保持1.5 min 流动相B在0.3 min内从95%降至0.1% 0.1%流动相B保持0.7 min (总时间：10.5 min)
检测条件:	UV 200 nm

样品2：含碱性分析物的血浆

采用本文介绍的96孔板(每个板孔含有10 mg吸附剂)SPE净化方案处理大鼠血浆(Bioreclamation IVT #RATPLEDTA2)和表1中列出的碱性分析物的混合物。随后使用之前介绍过的萃取前加标和萃取后加标步骤3。具体操作为，在每个SPE方案的上样步骤中，向四个吸附剂孔内加入血浆和分析物(萃取前加标)，另外四个吸附剂孔内只加入空白血浆。在洗脱步骤中，向空白血浆板孔的洗脱液中加入分析物(后加标)。萃取前加标和萃取后加标的板孔在最终洗脱步骤之后均可达到31.3 ng/孔的洗脱液浓度。对萃取前加标和萃取后加标的样品经洗脱步骤得到的萃取物进行多重反应监测(MRM)分析，根据萃取前加标样品中分析物的平均响应与萃取后加标样品中对应分析物的平均响应之比得到各个SPE方案的分析物回收率(%)。使用洗脱步骤所得萃取物的磷脂酰胆碱(PC)和溶血磷脂酰胆碱(LPC) MRM峰面积总平均值比较不同SPE方案的残余磷脂浓度。

仪器:	ACQUITY UPLC I-Class系统与 Xevo TQ-S质谱仪(MS/MS)
数据管理:	MassLynx 4.1版

方法条件

色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C_{18} 1.7 µm, 2.1 × 100 mm (部件号：186002352)
柱温:	40 °C
进样体积:	2.0 µL
流速:	0.6 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度:	2%流动相B保持1 min 流动相B在3 min内从2%增至70% 流动相B在0.1 min内从70%增至95% 95%流动相B保持2.9 min 流动相B在0.5 min内从95%降至2% 2%流动相B保持0.5 min (总时间：8.0 min)
检测条件:	ESI正离子MRM (MS/MS多重反应监测) 见表1和表2。
锥孔电压:	30 V
毛细管电压:	1.5 kV
锥孔气流速:	150 L/h
脱溶剂气流速:	1000 L/h
喷雾器压力(bar):	7.0
脱溶剂气温度:	500 °C

表1. 碱性分析物：MRM通道/条件和pKa值。

化合物 I.D.	化合物名称	化合物pKa (参考文献5)	母离子 (M+H)	子离子质量 (M+H)	碰撞电压
1	咖啡因	10.4	195.16	106.04	30
2	羟吗啡酮	8.17	302.17	198.24	44
3	普鲁卡因胺	9.32	236.10	120.25	30
4	甲基苯丙胺	9.87	150.24	91.04	15
5	羟考酮	8.53	316.10	241.08	30
6	可待因	8.21	300.20	165.10	30
7	MDMA	10.38	194.21	105.18	22
8	可乐定	8.05	230.09	159.94	30
9	地西泮	3.4	285.07	154.94	30
10	利培酮	8.76	411.32	110.17	50
11	普萘洛尔	9.42	260.26	116.23	18
12	普罗替林	8.2	264.27	155.19	20
13	阿米替林	9.4	278.23	91.19	24
14	维拉帕米	8.92	455.44	150.17	44
15	苯环己哌啶(PCP)	8.29	244.17	86.02	10

表2. PC和LPC类磷脂：MRM通道/条件。

磷脂 I.D.*	母离子 (M+H)	子离子质量 (M+H)	碰撞电压 (V)
LPC 16:0	496.40	184.10	30
LPC 18:2	520.40	184.10	30
LPC 18:1	522.40	184.10	30
LPC 18:0	524.40	184.10	30
PC 30:1	704.40	184.10	30
PC 34:2	758.40	184.10	30
PC 34:1	760.40	184.10	30
PC 36:3	784.40	184.10	30
PC 36:2	786.40	184.10	30
PC 38:6	806.40	184.10	30
PC 38:5	808.40	184.10	30

**LPC为溶血磷脂酰胆碱，PC为磷脂酰胆碱。第一个数字是尾部的碳原子总数，第二个数字是尾部的双键数量。*

结果与讨论

背景

血浆中的磷脂主要是磷脂酰胆碱(PC)类，其在人血浆总磷脂中约占70%。溶血磷脂酰胆碱(LPC)约占人血浆总磷脂的10% [6]。如图1所示，这些磷脂可分为两个部分：极性的头部和一个或两个非极性尾部。极性头部包含一个离子化基团(带正电荷的季胺)和一个可电离部分(带负电荷的磷酸盐)。因此，极性头部的亲水性极强，在水溶液中会被水溶剂层包围。非极性尾部可以是任意碳原子数量的长链饱和/不饱和脂肪酸酯，形成疏水性极强的区域。PC在水溶液中会形成双分子层，以便最大程度减小尾部与水的相互作用。由于存在这些差异极大的结构区域，去除磷脂变得颇为棘手。

使用混合模式RP/SCX SPE吸附剂(如Oasis MCX[7])时，磷脂尾部可与吸附剂中的烃基部分进行疏水性接触。而极性头部可通过两种方式与吸附剂发生相互作用：水溶剂化的头部可通过氢键与吸附剂中的极性基团结合，另外，正离子化的季铵盐和负离子化的磷酸基团可与吸附剂发生离子相互作用。据报道，PC中磷酸基团的pKa为2.6 [8]。在pH高于约2.6的溶液中，头部基团主要为两性离子结构，因此不含净电荷[9]。

但随着pH降至大约2.6以下，越来越多的磷酸基团被中和，磷脂头部的净正电荷数量逐渐增加。SCX SPE吸附剂将磺酸基团作为进行强阳离子交换的基团。这类基团的pKa极低，在0.5以下。因此，PC和LPC能够在酸性条件下与SCX型吸附剂发生阳离子交换，如图2所示。

使用现有的混合模式RP/SCX SPE方案制备碱性化合物时，需要在酸性条件下(例如，磷酸稀释剂)上样，其目的是确保碱性化合物通过阳离子交换和反相作用得到保留。然后使用酸性水溶液清洗吸附剂以去除极性干扰物质，再使用有机溶剂清洗以去除非极性干扰物质。最后，使用含有强碱的有机溶剂洗脱分析物。这是采用Oasis MCX 2 x 4方案1萃取碱性分析物的基本原理[10]。

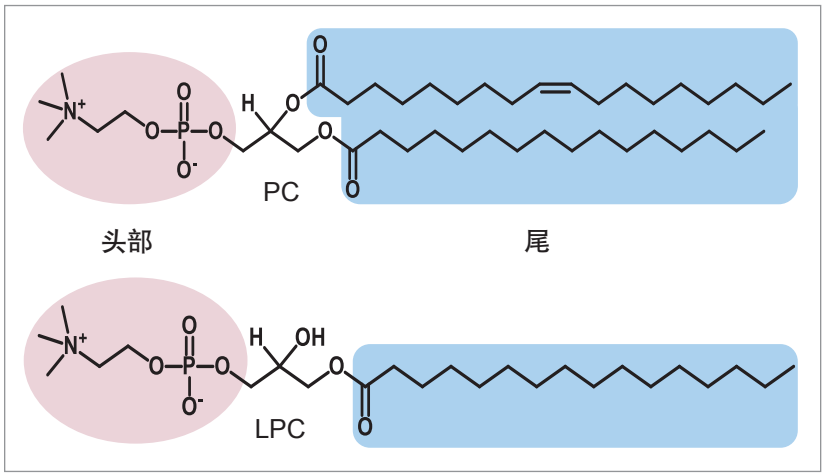


图1. 磷脂酰胆碱(PC)和溶血磷脂酰胆碱(LPC)的典型结构。

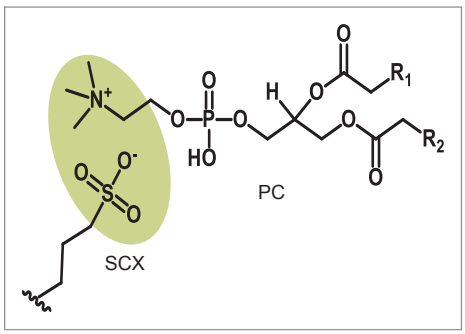


图2. PC头部与SCX吸附剂可能发生的阳离子交换。

使用OASIS PRIME MCX 4步方案提取血浆中的碱性分析物

本研究评估了Oasis PRiME MCX 4步方案和Oasis MCX 2 x 4方案1对加标至大鼠血浆中的一组碱性分析物的萃取效果。Oasis PRiME MCX 96孔板(10 mg/孔)(部件号：186008915)的SPE方案如图5所示。按照上述方法[11]使用串联质谱(MS/MS)测定洗脱步骤所得洗脱液中的磷脂浓度。通过比较萃取前加标的样品和萃取后加标的样品的MS峰面积来确定这15种分析物的回收率[10]。上样之前，使用4%磷酸水溶液按照1:1的体积比稀释血浆样品。图6所示的结果表明，与Oasis MCX 2 x 4方案1相比，Oasis PRiME MCX 4步方案洗脱步骤所得洗脱液中的磷脂含量降低了大约10倍。除地西泮外，其它分析物两种方法都具有较高的回收率，如图7所示。与其它分析物不同，地西泮是一种弱碱(pKa 3.4)，会在Oasis PRiME MCX 4步方案的水溶液清洗步骤(pH约为2.8)中被去除。这些结果表明，对于pKa值大于5的多种碱性分析物，Oasis PRiME MCX 4步方案均可实现较高的回收率，而且残留磷脂浓度降低了大约10倍。

使用OASIS PRIME MCX 3步方案提取血浆中的碱性分析物

对于水性样品，还可以进一步简化Oasis PRiME MCX 4步方案。我们发现，如果在上样步骤中使用100 mM甲酸铵，可省去水溶液清洗步骤，而不会影响磷脂去除效果或分析物回收率。这种Oasis PRiME MCX 3步方案如图5所示。我们采用该方法分析了加标大鼠血浆样品，结果见图6，所用的定量策略与前文所述的相同。磷脂平均浓度稍高于Oasis PRiME MCX 4步方案，但远低于使用Oasis MCX 2 x 4方案1所得的结果。如图7所示，该方法的分析物回收率与Oasis PRiME MCX 4步方案不相上下。Oasis PRiME MCX 3步方案大大简化了工作流程。如果存在疏水性干扰物，则应评估两种Oasis PRiME MCX方案，因为3步优化方案中没有水溶液清洗步骤。

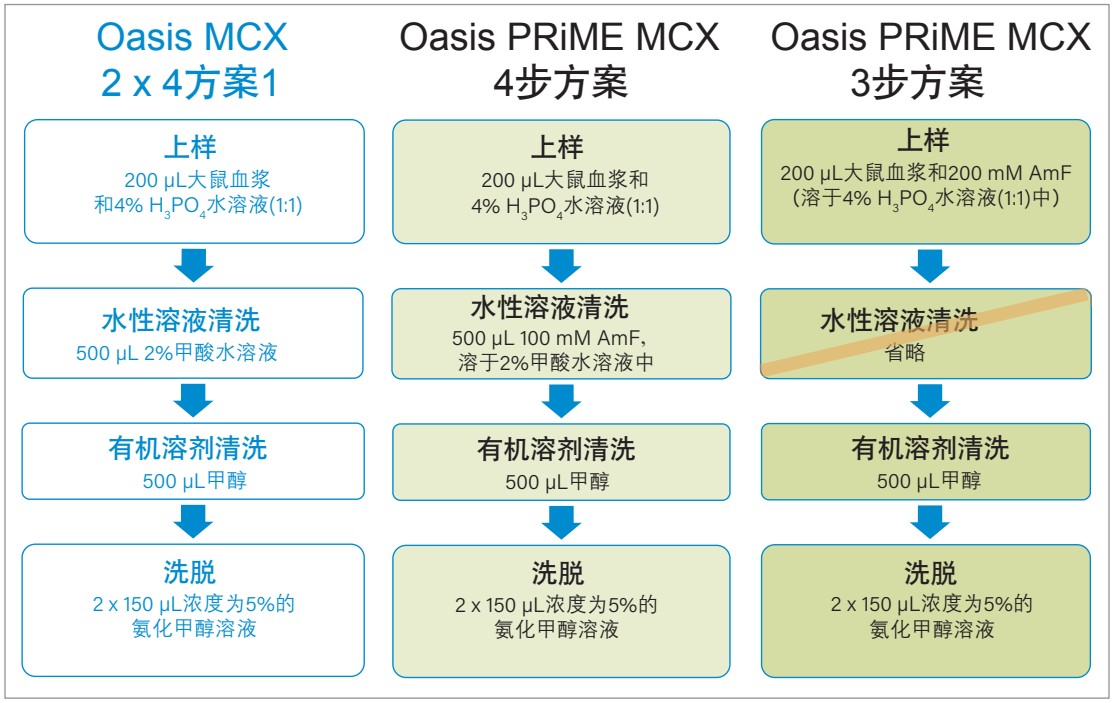


图5. Oasis MCX和Oasis PRiME MCX 96孔板(10 mg/孔)的SPE方案； Oasis PRiME MCX方案正在申请专利。

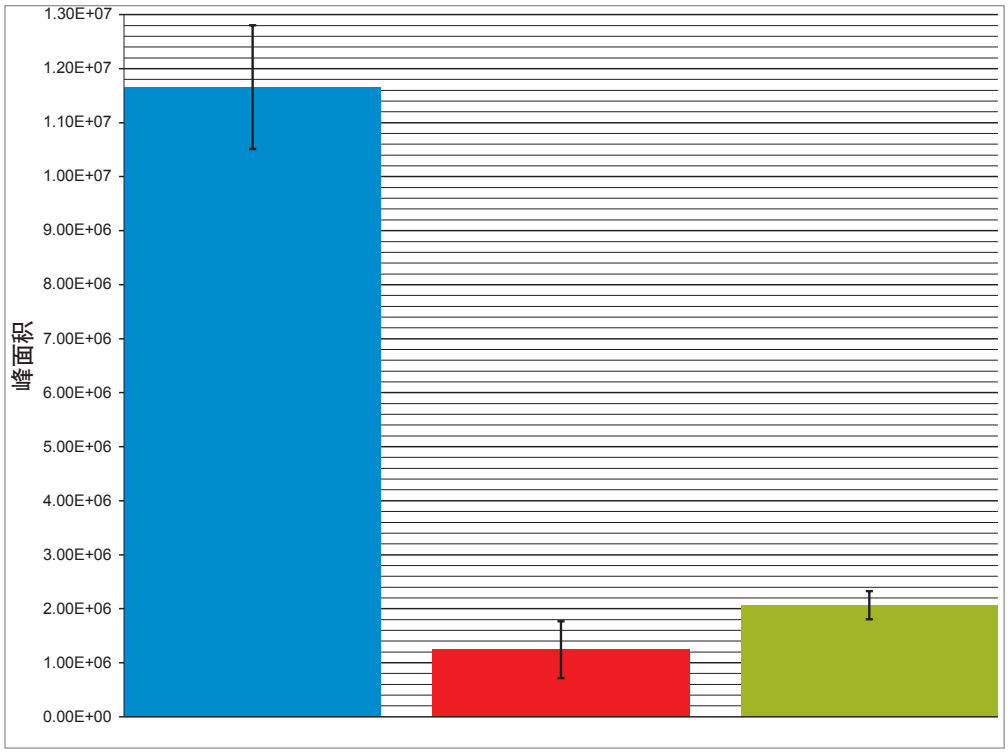


图6. 使用Oasis MCX 2 x 4方案1(蓝色，左)、Oasis PRiME MCX 4步方案(红色，中)和Oasis PRiME MCX 3步方案(绿色，右)在洗脱步骤中得到的大鼠血浆中磷脂的峰面积。条柱表示标准偏差(n=8)。

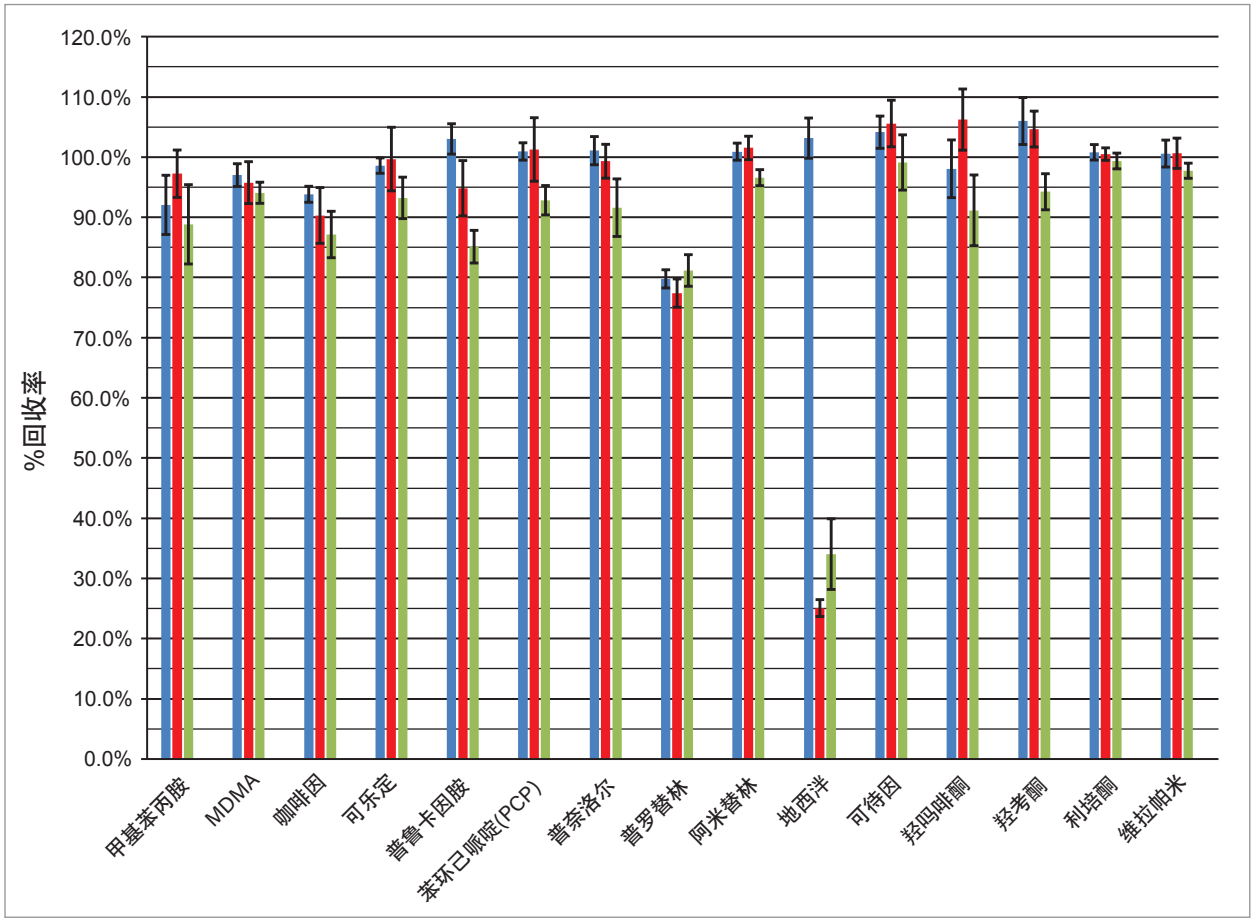


图7. 使用Oasis MCX 2 x 4方案1(蓝色，左)、Oasis PRiME MCX 4步方案(红色，中)和Oasis PRiME MCX 3步方案(绿色，右)在洗脱步骤中得到的大鼠血浆中15种碱性化合物的分析物回收率。条柱表示标准偏差(n=4)。

结论

本应用纪要重点讨论了使用Oasis PRiME MCX样品制备产品萃取血浆中碱性分析物的改良SPE方法。相较于Oasis MCX 2 x 4方案1，全新的Oasis PRiME MCX方案大大降低了磷脂浓度，同时可使pKa值大于5的分析物保持可重现的高回收率。使用这些新方案可获得残留磷脂更少的样品，有望在LC-MS应用中降低基质效应，以及减少色谱柱和LC-MS系统的污染问题。

参考文献

1. Hall, T. G.; Smukste, I.; Bresciano, K. R.; Want, Y.; McKearn, D.; Savage, R. E. Identifying and Overcoming Matrix Effects in Drug Discovery and Development. In *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*; Prasain, J., Ed.; In Tech, 2012; pp 389–420.
2. Michopoulos, F.; Edge, A. M.; Hui, Y-T.; Liddicoat, T.; Theodoridis, G.; Wilson, I. D. Extraction Methods for the Removal of Phospholipids and other Endogenous Material from a Biological Fluid. *Bioanalysis* 2011, 3, 2747–2755.
3. Chambers, E; Wagroswski-Diehl, D. M.; Lu, Z., Mazzeo, J. R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC-MS/MS analyses. *J. Chromatogr.*, B 2007, 852, 22–34.
4. Neville, D.; Houghton, R.; Garrett, S. Efficacy of Plasma Phospholipid Removal During Sample Preparation and Subsequent Retention Under Typical UHPLC Conditions. *Bioanalysis* 2012, 4, 795–807.
5. The pK_a values were obtained from [a] www.drugbank.ca, [b] www.drugfuture.com/chemdata, [c] pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/risperidone (all accessed December 5, 2017) and [d] Garrett, E. R.; Seyda, K.; Marroum, P. High performance liquid chromatographic assays of the illicit designer drug "Ecstasy", a modified amphetamine, with applications to stability, partitioning and plasma protein binding. *Acta Pharm. Nord.* 1991, 3, 9–14.
6. Ismaiel, O. A.; Zhang, T.; Jenkins, R. G.; Karnes, H. T. Investigation of Endogenous Blood Plasma Phospholipids, Cholesterol and Glycerides that Contribute to Matrix Effects in Bioanalysis by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.*, B 2010, 878, 3303–3316.
7. Arsenault, J. C. Beginner's Guide to SPE; Waters Corp., 2012; p 194.
8. Petelska, A. D.; Figaszewski, Z. A. Effect of pH on the Interfacial Tension of Lipid Bilayer Membrane. *Biophys. J.* 2000, 78, 812–817.
9. Naumowicz, M; Figaszewski, Z. A.; Poltorak, L. Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Useful Method for Examination of the Acid–Base Equilibria at Interface Separating Electrolyte Solution and Phosphatidylcholine Bilayer. *Electrochim. Acta* 2013, 91, 367–372.
10. Oasis Cartridge and 96-Well Plate Care and Use Manual, literature number 716001391EN, Section VII, Waters Corp. (2017).
11. Zhang, X.; Danaceau, J. P.; Chambers, E. E. Simple, Fast, and Clean Extraction of Synthetic Cannabinoids from Whole Blood Using Oasis PRiME HLB, Application Note literature number 720005417EN, Waters Corp. (2015).

扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。Oasis、ACQUITY、Xevo、Empower、MassLynx和UPLC是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2018年 沃特世公司。中国印刷。2018年1月 720006178ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com