Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用UPLC/MS/MS定量分析尿液中的巴比妥类药物

Rob Lee[1]，Allan Traynor[2]，Jane LeCount[2] and Michelle Wood[1]
[1]沃特世公司MS技术中心（英国曼彻斯特）
[2]Concateno plc（英国伦敦）

应用优势

- 无需提取步骤
- 无需分析前的衍生化处理步骤
- 提高样品通量

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC®系统

Xevo® TQ质谱仪

ACQUITY® BEH C_{18}色谱柱

Waters®最大回收样品瓶

关键词

巴比妥类药物，UPLC/MS/MS

简介

巴比妥类药物是一种中枢神经系统抑制剂，可产生从轻度镇静到全身麻醉的不同效果。作为处方药，由于其治疗指数较低且依赖性高，故而大多时候都会被苯二氮卓类药物取代。但众所周知，在东欧某些地区，巴比妥类药物的使用仍然很普遍[1]。因此，这类药物的分析对于法医分析和工作场所药物检测仍十分重要。

过去，通常采用GC对巴比妥类药物进行测定[2,3]。随着现代实验室逐渐引进UPLC®/MS/MS等新技术，将多种分析方法结合并将现有方法转换到新的平台上显得十分必要。此外，借助UPLC/MS/MS可以开发出更为灵敏的方法。

本文报告了一种基于简单稀释和UPLC/MS/MS的定量方法。该方法已通过验证，并使用真实样品对其性能进行了评估。所得数据也与传统方法（先执行液-液萃取，再进行衍生化处理和GC/MS分析）取得的结果进行了对比。

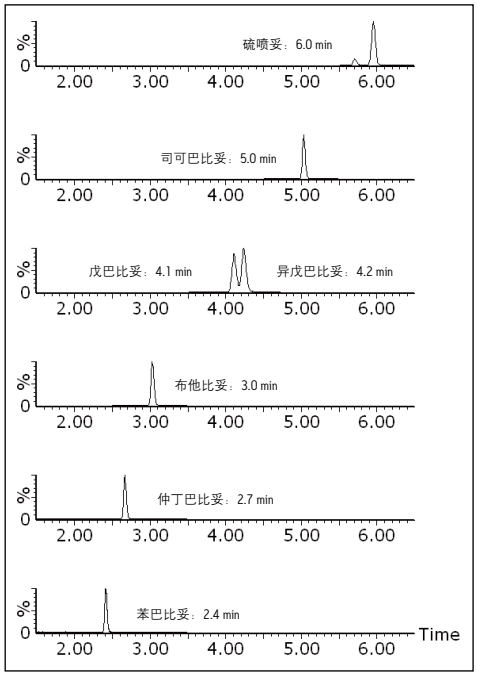

图1. 500 ng/mL巴比妥类药物加标尿液样品的色谱图。

实验

方法条件

UPLC条件

系统：	ACQUITY UPLC
色谱柱：	ACQUITY BEH C_{18} 2.1 × 100 mm和BEH C_{18} 2.1 × 5 mm Vanguard预柱
柱温：	50 °C
样品温度：	5 °C
进样体积：	15 µL (PLNO)
强清洗液：	0.001%甲酸的乙腈溶液
弱清洗液：	0.001%甲酸的水溶液
流速：	400 µL/min
流动相A：	0.001%甲酸的水溶液
流动相B：	0.001%甲酸的乙腈溶液
梯度：	流动相B以5%保持0.5 min，然后增加至27.5%，保持4 min，再增加至35%，保持5.25 min，然后增加至90%，保持6.25 min，然后降低至5%

MS条件

质谱仪：	Xevo TQ
电离模式：	ESI-
毛细管电压：	2.75 kV
锥孔电压：	25 V
碰撞能量：	12 eV
脱溶剂气温度：	500 °C
脱溶剂气：	1000 L/h
锥孔气：	25 L/h
采集模式：	多反应监测（MRM）如表1 所示

样品描述

苯巴比妥和硫喷妥均购自Sigma Aldrich公司（英国多塞特），将其溶解于甲醇中至浓度为1 mg/mL。所有其它巴比妥类药物（1 mg/mL）和氘代内标（ISTD）(0.1 mg/mL）均为经认证的标准溶液，购自LGC Standards公司（英国特丁顿）。并非全部巴比妥类药物都有相应的氘代内标。

质量控制参比尿液样品（Bio-Rad Liquichek尿液毒理学对照：C2、C3、C4、S1和S2）购自Bio-Rad Laboratories公司（英国赫默尔亨普斯特德）。

用于方法开发的尿液样本来自沃特世公司的捐赠者。

19个含有巴比妥类药物的预分析样本来自Concateno（英国伦敦）。

样品制备

将尿液样品和校准品在13000 rpm下离心5 min，然后取50 µL移至沃特世最大回收样品瓶，再用950 µL含有25 ng各种ISTD的水溶液进行稀释。

巴比妥类药物	母离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	ISTD
异戊巴比妥	225.1	182.0	戊巴比妥-d5
仲丁巴比妥	211.1	168.0	苯巴比妥-d5
布他比妥	223.0	180.0	布他比妥-d5
戊巴比妥	225.1	182.0	戊巴比妥-d5
苯巴比妥	231.1	188.0	苯巴比妥-d5
司可巴比妥	237.1	194.1	司可巴比妥-d5
硫喷妥	241.1	57.9	司可巴比妥-d5
布他比妥-d5	228.0	185.0	
戊巴比妥-d5	230.1	186.9	
苯巴比妥-d5	236.1	193.0	
司可巴比妥-d5	242.1	199.1	

表1. 分析物和ISTD的MRM通道。

数据管理

MassLynx™ 4.1版，结合TargetLynx™应用软件

结果与讨论

方法验证

全部巴比妥类药物和ISTD的MRM通道如表1所示，均在单个通道下进行监测。图1示出了500 ng/mL巴比妥类药物加标尿液的色谱图。

为了对全部巴比妥类药物进行线性研究，分别制备了浓度为0、25、50、100、250、500、1000、750、1250和1500 ng/mL的加标尿样校准品。样品用如前所述的ISTD水溶液稀释20倍，再进行UPLC/MS/MS分析。

通过对每种分析物MRM谱线峰下方面积进行积分并参照相应的ISTD峰面积进行定量。使用TargetLynx应用软件处理数据，然后通过1/x加权绘制校准曲线。日间相关系数（五日评估值）大于0.995。

检测限（LOD）为加标尿液中产生大于5:1的信噪比时的最低浓度。定量下限（LLOQ）定义为信噪比>10:1时的最低浓度，并且所得平均浓度偏差需小于目标值的20%且加标尿液的RSD%需小于20%。LOD和LLOQ汇总于表2中。

在以下浓度水平对巴比妥类药物的基质效应（6个不同的空白尿液源）平行测定三次：100（低）、500（中）和1000 ng/mL（高）。将加标尿液样品的响应与水中的响应进行对比以确定基质效应。各巴比妥类药物的结果如表2所示。6个尿液样品在每个浓度下的RSD%均小于20%。分析来自五个不同日期的三个质控（QC）浓度（150、600和1200 ng/mL）的样品，评估日间准确度和精度。质控品在五个不同日期、三个浓度水平下重复测试的平均值在目标值的10%范围内，且RSD%小于15%，如表3所示。

	LOD	LLOQ	基质效应%		
	ng/mL	ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL	1000 ng/mL
异戊巴比妥	5	20	102.7 (2.4)	101.8 (2.3)	101.4 (2.3)
仲丁巴比妥	5	20	85.1 (12.9)	83.2 (14.1)	83.6 (14.0)
布他比妥	5	20	104.0 (4.6)	96.0 (4.4)	95.3 (4.7)
戊巴比妥	5	20	97.4 (1.8)	98.4 (3.1)	98.5 (2.5)
苯巴比妥	5	20	84.8 (14.8)	85.6 (12.9)	86.2 (12.1)
司可巴比妥	5	20	105.7 (2.8)	102.9 (2.4)	102.7 (1.7)
硫喷妥	5	20	93.5 (1.8)	91.4 (2.8)	91.0 (3.3)

表2. 巴比妥类药物加标尿液在低、中、高浓度下的LOD、LLOQ和平均基质效应% (n=6)。括号中的数值为RSD%。

	日间准确度 目标值%			日间精度 RSD%		
	150 ng/mL	600 ng/mL	100 ng/mL	150 ng/mL	600 ng/mL	1200 ng/mL
异戊巴比妥	104.1	108.0	99.3	5.7	2.4	1.6
仲丁巴比妥	103.3	106.0	101.0	5.6	2.1	2.6
布他比妥	103.4	108.3	99.9	5.8	2.1	3.3
戊巴比妥	102.5	108.4	101.9	4.9	1.7	1.6
苯巴比妥	103.3	106.8	98.4	5.3	2.3	3.2
司可巴比妥	105.3	108.7	98.3	4.9	1.2	1.4
硫喷妥	103.5	107.0	97.3	7.9	4.2	3.4

表3. 巴比妥类药物加标尿液在三个QC浓度水平下的日间准确度和精度（n=20）。

真实尿液样品和质量控制参比尿液样品的分析

将全部19个真实尿液样品和5个质控参比尿液稀释并利用UPLC/MS/MS进行分析，计算所检出巴比妥类药物的浓度。要通过UPLC/MS/MS方法实现对巴比妥类药物的阳性鉴别，分析物保留时间必须在预期保留时间的0.2 min范围内。苯巴比妥是真实尿液样品中唯一存在的巴比妥类药物，在全部19个样品中均被检出，其中17个样品的结果在校准范围内。图2所示为375 ng/mL苯巴比妥阳性尿液样品与阴性对照的对比。

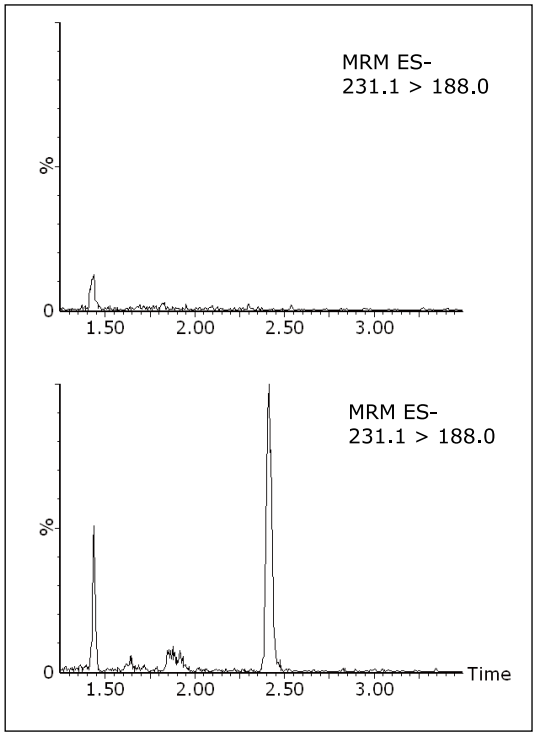

图2. 375 ng/mL苯巴比妥的阳性结果。上方迹线为空白尿液校准品，下方迹线为真实样品。

将这些值与独立实验室在液-液萃取后进行衍生化处理，再使用GC/MS分析所取得的结果进行对比。两组数据之间具有极佳的相关性（r^2），如图3所示。在商用参比尿液C2、C3和C4中发现了异戊巴比妥、布他比妥、戊巴比妥、苯巴比妥和司可巴比妥，而在参比尿液S1和S2中仅发现了司可巴比妥。经GC分析，商用参比尿液的UPLC/MS/MS数据与供应商给出的浓度之间的相关性大于0.9971。

使用简单的样品稀释代替液-液萃取，可以缩短样品制备时间并减少样品用量，例如当液-液萃取需要1 mL样品时，稀释只需要50 µL。进样前，现代GC/MS方法需要使用苯基三甲基氢氧化铵和乙酸乙酯在GC的热进样口对巴比妥类药物进行甲基化处理。UPLC/MS/MS分析不需要对巴比妥类药物进行衍生化，从而省略了这一步骤。在这些因素的共同作用下，样本通量得以提高。

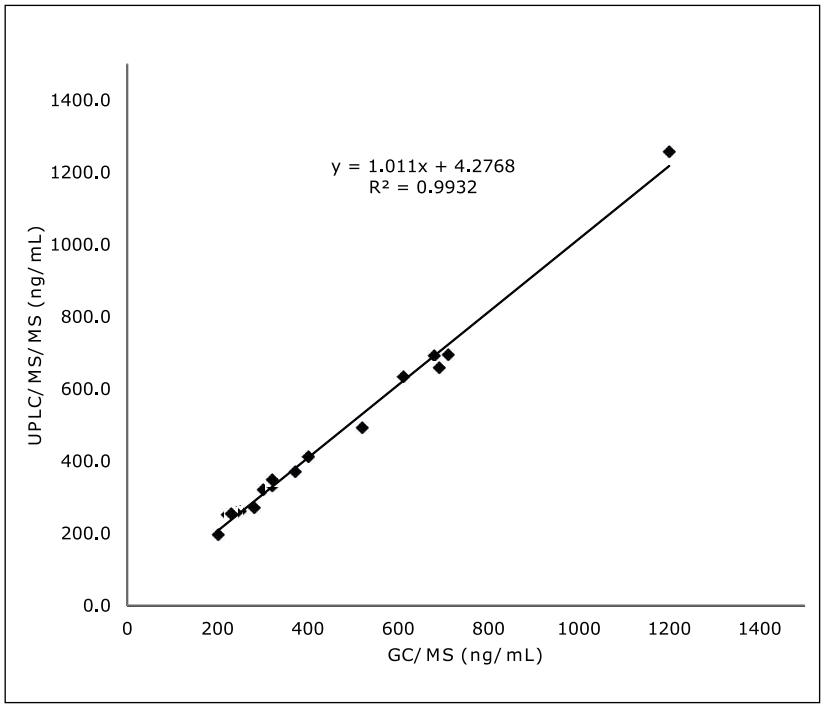

图3. 使用GC/MS和UPLC/MS/MS分析苯巴比妥的对比。

结论

法医和工作场所药物检测实验室都需要对巴比妥类药物进行监测，因此需要一种准确、可靠且稳定的方法来对生物样品中的这些化合物进行定量分析。

Xevo TQ MS可满足在这一特定基质中检测巴比妥类药物所需的灵敏度要求，并且不必进行提取后浓度处理步骤。利用UPLC/MS/MS分析巴比妥类药物时，只需进行非常简单的样品稀释步骤，同时省略了GC/MS分析所需的液-液萃取和提取后衍生化处理步骤。提取步骤的省去可以使制备一批样品的时间缩短50%以上。

只需8.5分钟的ACQUITY UPLC系统分离方法与目前分析巴比妥类药物所用的GC方法类似，当与简单的样本稀释步骤相结合时，便能实现更高的样品通量。

在对19个人体尿液样品进行的苯巴比妥分析中，UPLC/MS/MS与替代GC/MS方法之间表现出极佳的相关性。

实验室在应用本方法之前，用户有必要对方法进行一次完整的验证。

致谢

感谢Concateno plc（英国伦敦）提供匿名真实尿液样本。

参考文献

1. Availability of Internationally Controlled Drugs: A Report of the International Narcotics Control Board. 2010.
2. Pocci R *et al. J Anal Toxicol.* 1992; 16(1): 45-72.
3. Johnsonn LL and Garg U. *Methods Mol Biol.* 2010; 603: 65-74.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

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

©2013 年沃特世公司。印制于中国。2013年1月 720004466ZH 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 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

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