Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用UPLC-MS/MS对尿液进行法医毒理学筛查的简化型混合模式样品制备策略

Jonathan P. Danaceau, Erin E. Chambers和Kenneth J. Fountain
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 在30分钟或更短时间内快速、简便地制备法医毒理学综合性样品组
- 显著节省溶剂用量和操作成本
- 38种化合物中有36种化合物获得90%以上的回收率
- 能够在4分钟内分析38种化合物
- 在葡糖苷酸化代谢物的分析中增加极性化合物的保留
- 所有样品预处理和萃取均在孔内完成，免除转移步骤

沃特世解决方案

- Xevo® TQD质谱仪
- ACQUITY UPLC® I-Class系统(固定定量环进样器)
- ACQUITY UPLC BEH苯基柱，1.7 µm, 2.1 x 100 mm (部件号186002352)
- Oasis® MCX µElution板 (部件号186001830BA)
- MassLynx®软件
- TargetLynx™应用软件

关键词

SPE，样品制备，法医毒理学，痛板，阿片类，苯二氮卓类，安非他命类，尿液，兴奋剂

简介

在法医毒理学中，药物筛查组通常包含诸如阿片类、苯二氮卓类和兴奋剂等常用物质。通常，研究人员使用多种筛查方法以获得多种药物的全面信息。这些方法可包括免疫分析、GC-MS、LC-MS/MS或组合方法。无论使用哪种方法，其目标都是实现足够高的灵敏度、特异性和准确度以继续进行适当的确认或以足够的信心确定样品检测结果呈阴性。

在法医毒理学筛查中，样品制备与仪器技术的选择均是重要的考虑因素。尽管许多实验室使用“稀释注入”法分析尿液毒理学样品组，但样品中的基质组分、缓冲液、残留的酶及其它物质会导致基质效应过高，使色谱柱使用寿命显著缩短，并且污染物在LC-MS的电喷雾离子源中发生积聚，从而增加仪器停机时间。

尽管固相萃取(SPE)常常被认为操作较难且非常耗时，但是合理选择方法可显著简化这一过程。作为选择性最高的样品制备方法，SPE能够获得比其它大多数技术更洁净的样品，成为获得准确结果的理想选择。

本文详细介绍了一套样品制备和UPLC®-MS/MS分析策略，可用于法医毒理学筛查中经常分析的综合性化合物组。在一种经过改良的简化萃取方法中，研究人员使用沃特世的Oasis MCX µElution板对一组化合物进行快速萃取，该组化合物包括阿片类、胺类兴奋剂、苯二氮卓类、苯甲酰芽子碱(BZE)和苯环己哌啶(PCP)。使用Waters® ACQUITY UPLC BEH苯基柱和Xevo TQD可实现UPLC-MS/MS分析。所有的样品制备步骤(包括酶水解)均在µElution板的孔内进行，并且该萃取方法经过了简化，免除了活化和平衡步骤，并将清洗步骤整合为一个步骤。

实验

所有标准品均得自Cerilliant (Round Rock, TX)。储备溶液以甲醇为溶剂进行配制。通过将储备溶液稀释到混合空白尿液中制得样品。所有分析物均列于表1中。

SPE萃取

将50 µL尿液分别加入到Oasis MCX µElution板(部件号186001830BA)的各个孔中，并向其中加入50 µL 0.5 M醋酸铵缓冲液和10 µL β-葡糖醛酸糖苷酶(Roche，大肠杆菌)以模拟酶水解反应中加入的所有试剂。然后加入 200 µL 4%H_3PO_4溶液，并对每个样品抽吸几次以充分混匀。然后通过抽真空使样品 吸附在孔中。随后用200 µL含0.02 N HCl的20% MeOH清洗所有样品。清洗后，在高真空(约15 in Hg柱)条件下使板干燥5–10 min，尽可能除去清洗溶液。然后，用50 µL含5%氨水溶液(Fisher, 28–30%)的60:40 ACN:MeOH溶液洗脱样品，并按相同条件再洗脱一次。所有样品均在40 °C的氮气环境中蒸干，并复溶于50 µL样品稀释液(2% ACN:1%甲酸，用MilliQ水配制)中。图1展示了萃取程序的工作流程。

方法条件

LC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-Class (FL)
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH苯基柱，1.7 µm, 2.1 x 100 mm (部件号186002352)
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C
进样量:	15 µL
流速:	0.6 mL/min
流动相A (MPA):	0.1%甲酸的MilliQ水溶液
流动相B (MPB):	0.1%甲酸的乙腈(ACN)溶液
梯度:	初始条件为95:5 MPA/MPB。

在5 min内，MPB的百分比增加至62.5%，在0.1 min内返回到5%，并在5%下保持0.9 min。整个循环时间为6.0 min。

MS条件

MS系统:	Xevo TQD
电离模式:	ESI正离子模式
采集范围:	针对各化合物优化的MRM
毛细管电压:	1.0 kV
碰撞能量:	针对各化合物优化(请参见表2)
锥孔电压:	针对各化合物优化(请参见表2)

数据管理

带TargetLynx应用软件的MassLynx

分析物回收率按照以下公式计算:

$$\%回收率 = \left(\frac{峰面积\ A}{峰面积\ B}\right) \times 100\%$$

其中，A =所萃取样品的峰面积，B =萃取基质样品后加入待测物的峰面积。

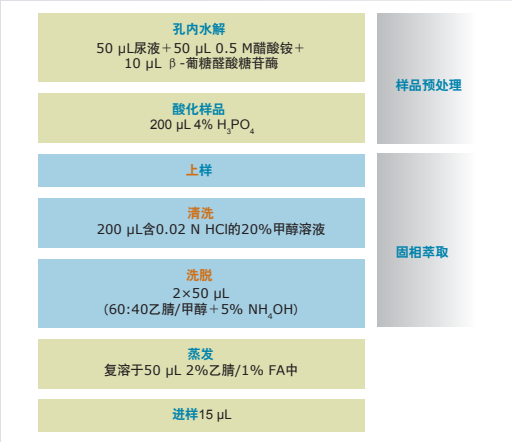

图1. 使用Oasis MCX µElution板分析法医毒理学综合性化合物组时所用萃取方法的详细信息。酶水解和样品预处理均在萃取板的孔内进行，最大程度减少了转移步骤。免除了活化和平衡步骤，并且用一步清洗代替两步清洗，大大简化了操作流程。

结果与讨论

所有测试化合物均列于表1中，图2展示了它们的色谱图。为便于查看，我们将化合物按相关类别分类。表2按照化合物的洗脱顺序列出了所有化合物的保留时间和MS条件。之前的研究结果1表明，与其它色谱柱相比，ACQUITY UPLC BEH苯基柱对极性阿片类化合物具有更出色的保留能力。该色谱方法利用UPLC能够提供更窄的峰形， 能够保留和分离极性最高的分析物，并能保持对同分异构体化合物的分离度，而且仍使所有化合物在四分钟内洗脱出来。所有同分异构体化合物组(包括吗啡-3-葡糖苷酸、氢吗啡酮-葡糖苷酸和吗啡-6-葡糖苷酸)均可轻松达到基线分离，确保准确鉴定和定量所有化合物。这样高的分离度有助于监测这些化合物以确保其完全水解，或用于需要直接定量分析这些代谢物的情况。甲基苯丙胺和苯丁胺之间也可实现基线分离，这两种化合物具有相同的主要产物离子 可能相互干扰。

峰编号	化合物	LOD (ng/mL)
1	吗啡-3-葡糖苷酸	10
2	吗啡-6-葡糖苷酸	10
3	吗啡	10
4	羟吗啡酮	5
5	氢吗啡酮	5
6	安非他命	1
7	纳洛酮	5
8	双氢可待因	1
9	可待因	5
10	MDA	1
11	去甲羟考酮	5
12	甲基苯丙胺	1
13	苯丁胺	1
14	O-去甲基曲马多	1
15	6-MAM	2
16	羟考酮	1
17	MDMA	1
18	氢可酮	1
19	MDEA	1

峰编号	化合物	LOD (ng/mL)
20	去甲芬太尼	1
21	7-氨基氯硝西泮	5
22	BZE	1
23	曲马多	1
24	他喷他多	1
25	去甲丁丙诺啡	1
26	PCP	1
27	芬太尼	1
28	氟西泮	1
29	丁丙诺啡	2
30	EDDP	1
31	α-羟基阿普唑仑	5
32	美沙酮	1
33	奥沙西泮	1
34	劳拉西泮	5
35	氯硝西泮	1
36	阿普唑仑	1
37	替马西泮	1
38	地西泮	1

表1. 化合物列表和检测限。

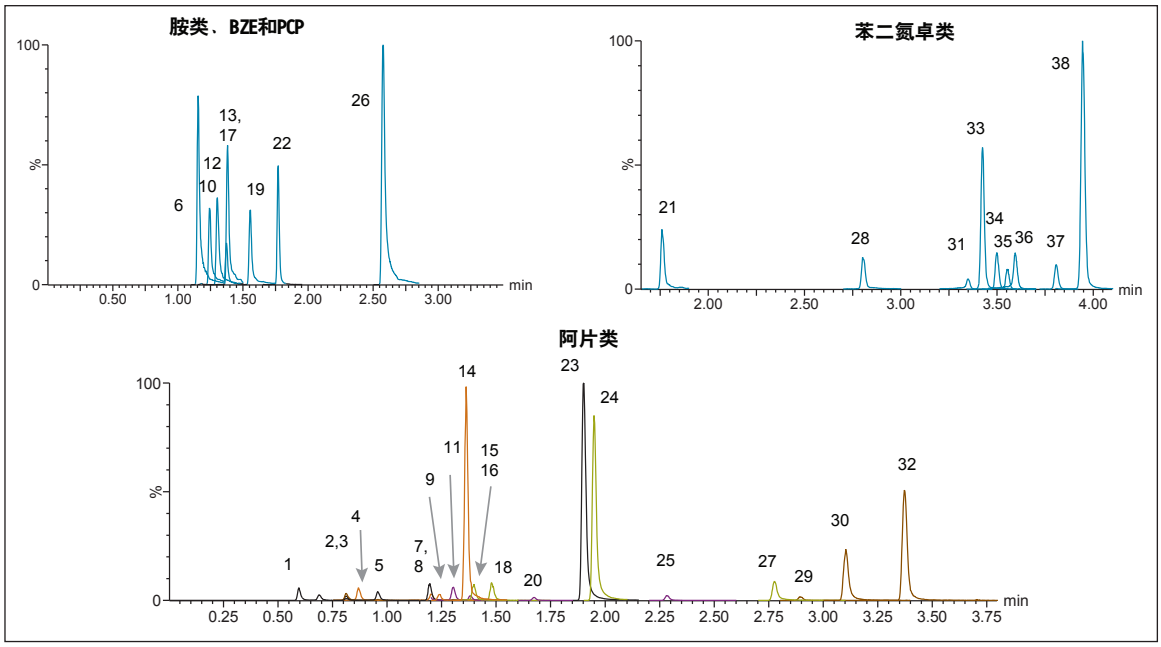

图2.本应用中所分析的法医毒理学综合性化合物组的色谱图。为便于查看，我们将化合物按相关类别进行了分类。有关化合物图例，请参见表1。
色谱柱：ACQUITY UPLC BEH苯基柱，1.7 µm, 2.1 x 100 mm。

化合物	RT	M+H+	MRM 产物离子	锥孔电压	碰撞能量
吗啡-3β-葡糖苷酸	0.59	462.17	286.1 201.1	58 58	52 30
吗啡-6β-葡糖苷酸	0.81	462.17	286.1 201.1	58 58	52 30
吗啡	0.81	286.2	201.1 165.1	54 54	28 34
羟吗啡酮	0.86	302.2	284.2 227.1	44 44	30 37
氢吗啡酮	0.95	286.1	185.0 157.0	65 65	46 62
安非他命	1.16	136	119.0 91.0	22 22	8 10
双氢可待因	1.18	302.2	199.1 128.1	60 60	45 75
纳洛酮	1.19	328.2	253.2 212.0	40 40	32 52
可待因	1.23	300.2	165.1 199.1	58 58	54 42
MDA	1.25	180.1	163.0 105.0	22 22	110 22
去甲羟考酮	1.29	302.1	187.1 227.1	36 36	26 30
甲基苯丙胺	1.31	302.1	91.0 119.1	24 24	20 10
苯丁胺	1.37	150.0	91.0 133.1	24 24	20 10
O-去甲基曲马多	1.35	250.2	58.2	30	20
6-乙酰基吗啡	1.36	328.2	165.1 211.1	56 56	58 40
羟考酮	1.37	316.2	298.2 241.1	44 44	25 44
MDMA	1.39	194.1	163.0 105.0	26 26	12 22
氢可酮	1.48	300.2	199.1 171.1	56 56	40 58
MDEA	1.57	208.1	105.0 135.1	26 26	24 20
去甲芬太尼	1.65	233.2	177.2 150.1	38 38	18 24
7-氨基氯硝西泮	1.77	286.1	121.1 222.1	48 48	26 26
苯甲酰芽子碱	1.78	290.1	168.1 105.0	36 36	18 32
曲马多	1.87	264.2	58.2	30	25
他喷他多	1.92	222.2	107.0 121.0	40 40	24 24
去甲丁丙诺啡	2.25	414.3	101.1 187.2	94 70	55 55
PCP	2.58	244.2	86.0 159.1	22 22	10 16
芬太尼	2.74	337.3	105.1 188.2	50 50	56 36
氟西泮	2.80	388.2	315.1 100.0	40 40	26 28
丁丙诺啡	2.85	468.4	101.1 396.3	82 82	68 55
EDDP	3.05	278.2	234.2 249.2	60 60	40 33
α-羟基阿普唑仑	3.35	325.1	297.1 243.1	50 50	26 38
美沙酮	3.33	310.3	105.0 265.2	32 32	38 20
奥沙西泮	3.43	287.0	104.0 241.1	44 44	30 32
劳拉西泮	3.51	321.0	229.1 194.0	40 40	28 50
氯硝西泮	3.56	316.0	214.1 241.1	54 54	42 40
阿普唑仑	3.60	309.1	205.1 274.1	60 60	42 26
替马西泮	3.82	301.1	177.1 255.1	36 36	46 10
地西泮	3.96	285.1	154.0 193.1	54 54	26 34

表2. 所有化合物的保留时间和MS条件。

图3显示了整组化合物的萃取回收率。除吗啡-3-葡糖苷酸以外，所有化合物的回收率均高于80%。所有化合物的平均回收率为100%。萃取效率也具有一致性。在38种化合物中，有37种化合物的变异系数(%CV)小于10%，而剩下化合物的变异系数也仅为12.5%。在方法开发过程中开展的一系列实验表明，清洗步骤中甲醇浓度超过20%会导致酸性苯二氮卓类药物(例如奥沙西泮、氯硝西泮、劳拉西泮和替马西泮)损失。因此，单步清洗中采用含0.02 N HCl的20%甲醇溶液。这一简单的改良实现了使用一种方法高效萃取整组化合物。

除了仅使用一种SPE方法即可萃取多种药物以外，我们还将该传统的六步混合模式SPE方法简化为三步。我们去除了活化和平衡步骤，并将两个清洗步骤(水相和有机相)合并为一步。免除这些步骤并不影响方法的萃取效率(未展示相关数据)，这得益于吸附剂的水浸润性特性。与传统的硅胶基吸附剂不同，Oasis吸附剂在干燥后不会失去保留性。这一特性还使所有样品的预处理在96孔板的孔内完成，免除了可能耗时或容易出错的各个转移步骤。将清洗步骤合并为一步还有助于加快工作流程。与传统的混合模式SPE工作流程(包括活化、平衡和两步清洗)相比，可省去一半的步骤。即将六步程序减少为三步程序，使处理时间缩短了50%。整个样品板在30分钟内即可完成处理。

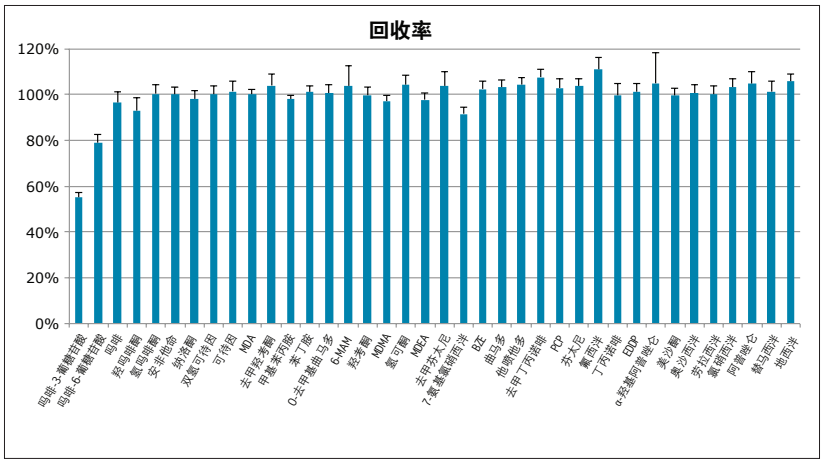

图3. 本应用中化合物的萃取回收率。数值代表3天期间执行的六次独立萃取的平均值(每天2次；每次萃取N = 4)。

我们提取了浓度为1、5、10、50和100 ng/mL(0.2、1.0、2.0、10和20 ng/mL的芬太尼、去甲芬太尼、6-乙酰基吗啡、去甲丁丙诺啡和丁丙诺啡)的五点校准曲线，以便对分析的检测限进行估算。检测限是指信号值高于萃取的基质空白五倍以上的点，并且偏差和%CV均小于20%。表1显示了各化合物计算所得的LOD。根据化合物的不同，这些值在1~10 ng/mL范围内变动。这表明该方法具有半定量筛查此类扩展的毒理学化合物组所需要的灵敏度和特异性。

结论

我们介绍了一种快速且具有普遍适用性的SPE方案和UPLC-MS/MS方法，其适用于分析法医毒理学筛查中常见的综合性化合物组。Oasis吸附剂独有的水浸润性特点使我们能够省去常用的活化和平衡步骤，并且该测试组中38种化合物中的任何一种均不会损失回收率或重现性。该特性还能够使整个水解步骤在Oasis MCX µElution板的孔内完成，免除了耗时且容易出错的转移步骤。再结合将两步清洗合并为一步的特点，该方法最终将六步萃取过程缩减为三步。尽管这一方法仍然比样品稀释稍微耗时一些，但它在30分钟内即可完成。此外，它还具有其他许多优势，包括提高灵敏度、减少基质干扰、延长分析柱使用寿命以及降低离子源污染的风险。

本方法专为分析酶水解样品而设计。使用ACQUITY UPLC BEH苯基柱也能分离和分析吗啡-3-葡糖苷酸和吗啡-6-葡糖苷酸，实现无需经过水解的直接分析。它还可监测这些葡糖苷酸的代谢物。由于使用β-葡糖醛酸糖苷酶难以完全水解这些化合物2，因此监测它们存在与否可作为确保其完全转化为游离药物的重要因素。

该方法能够快速萃取和分析用于法医毒理学筛查的大型药物组。将萃取方法与色谱系统的ACQUITY UPLC BEH苯基柱配合使用时，可提供一套快速的特异性方法，该方法具备准确筛查此类化合物组所需的灵敏度和重现性。

参考文献

1. Danaceau JP, Chambers E, Fountain KJ. Advantages of CORTECS C_{18} 2.7 µm and XBridge Phenyl XP 2.5 µm Columns for the Analysis of a Comprehensive Panel of Pain Management Drugs for Forensic Toxicology. Waters Application Note. 2014; Literature Code 720005185en.
2. Wang P, Stone JA, Chen KH, Gross SF, Haller CA, Wu AH. Incomplete recovery of prescription opioids in urine using enzymatic hydrolysis of glucuronide metabolites. J *Anal Toxicol.* 2006 Oct;30(8):570–5.

扫一扫，关注沃特世微信

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, Xevo, ACQUITY UPLC, Oasis, UPLC, CORTECS, XBridge和MassLynx是沃特世公司的注册商标。TargetLynx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。

©2015年 沃特世公司。印制于中国。2015年1月 720005290ZH LM-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 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

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