

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 进行血液中的 5 种毒物检测

LCMSMS-149

摘要： 建立使用超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定血液中 5 种毒物的方法。样品经处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用进行定量分析。使用外标法绘制 5 种毒物的校准曲线，获得良好的线性结果，校准曲线的 r^2 均在 0.99 以上。对 0.05 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 和 5 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.008 %~0.116 % 和 0.50 %~7.42 % 之间，系统精密度良好。

关键词： 三重四极杆质谱；毒物检测

本实验建立了使用超高效液相色谱三重四极杆法检测在法医毒物分析中几种有代表性毒物的方法。

高效液相色谱 - 串联质谱联用技术具有高选择性、高灵敏度，准确度高，是目前微量定量分析的首选方法。

本文建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 串联三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血液中三唑仑、佳静安定、乌头碱、舒乐安定、安定等 5 种毒物的分析方法。

实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。

1.2 分析条件

液相条件

流动相：A 相 -5mM 乙酸铵水溶液；B 相 - 甲醇

总流速：0.3 mL/min

色谱柱：InertsilODS4 (3.0 mm I.D.×150 mm L., 2 μm)

进样体积：20 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 10 %，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	10
20.00	Pumps	Pump B Conc.	100
25.00	Pumps	Pump B Conc.	100
25.10	Pumps	Pump B Conc.	10
30.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8050

离子源：ESI，正离子模式

接口加热温度：400℃

加热气流速：10L/min

加热模块温度：200℃

DL 温度：200℃

雾化气流速：3.0 L/min

干燥气流速：10 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：10 ms

延迟时间：1ms

MRM 参数：见表 2

表 2 各种毒物 MRM 优化参数

名称	英文名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
乌头碱	Aconitine	302-27-2	646.20	586.10*	-32.0	-36.0	-28.0
				105.20	-32.0	-55.0	-20.0
舒乐安定	Estazolam	29975-16-4	295.00	266.95*	-14.0	-23.0	-27.0
				205.00	-14.0	-41.0	-21.0
三唑仑	Triazolam	28911-01-5	343.00	308.00*	-16.0	-26.0	-21.0
				239.05	-16.0	-44.0	-24.0
佳静安定	Alprazolam	28981-97-7	309.00	280.95*	-15.0	-25.0	-30.0
				205.00	-15.0	-44.0	-21.0
安定	Diazepam	439-14-5	285.00	193.15*	-20.0	-33.0	-19.0
				-20.0	-26.0	-30.0	-20.0

注：*表示定量离子

1.3 标准品溶液的配制

标准工作溶液配制：配制浓度为 100 μg/L 的 5 种毒物浓度标准储备液，用甲醇：水 +5 mM 乙酸铵 =1:1 的混合溶液稀释配制浓度为 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100 μg/L 系列浓度混合标准品曲线。

结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

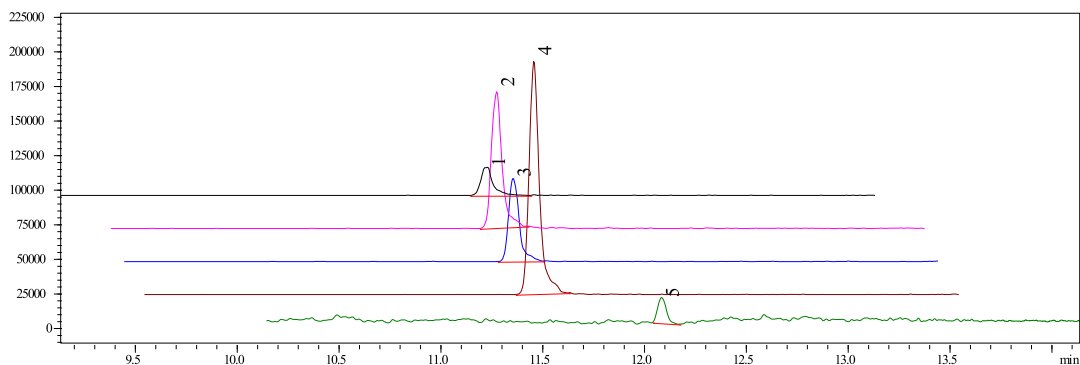


图 1 5 毒物标准品的 MRM 色谱图(0.5 μg/L)

(1 乌头碱; 2 舒乐安定; 3 三唑仑; 4 佳静安定; 5 安定.)

2.2 线性范围

将 0.01,0.05,0.1,0.5,1,5,10,50,100 $\mu\text{g/L}$ 系列浓度混合标准品按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，加权方式为 $1/C^2$ 绘制校准曲线如图 2 所示，5 种毒物的校准曲线线性关系良好，各浓度点准确度均在线性方程及 R^2 见表 3。

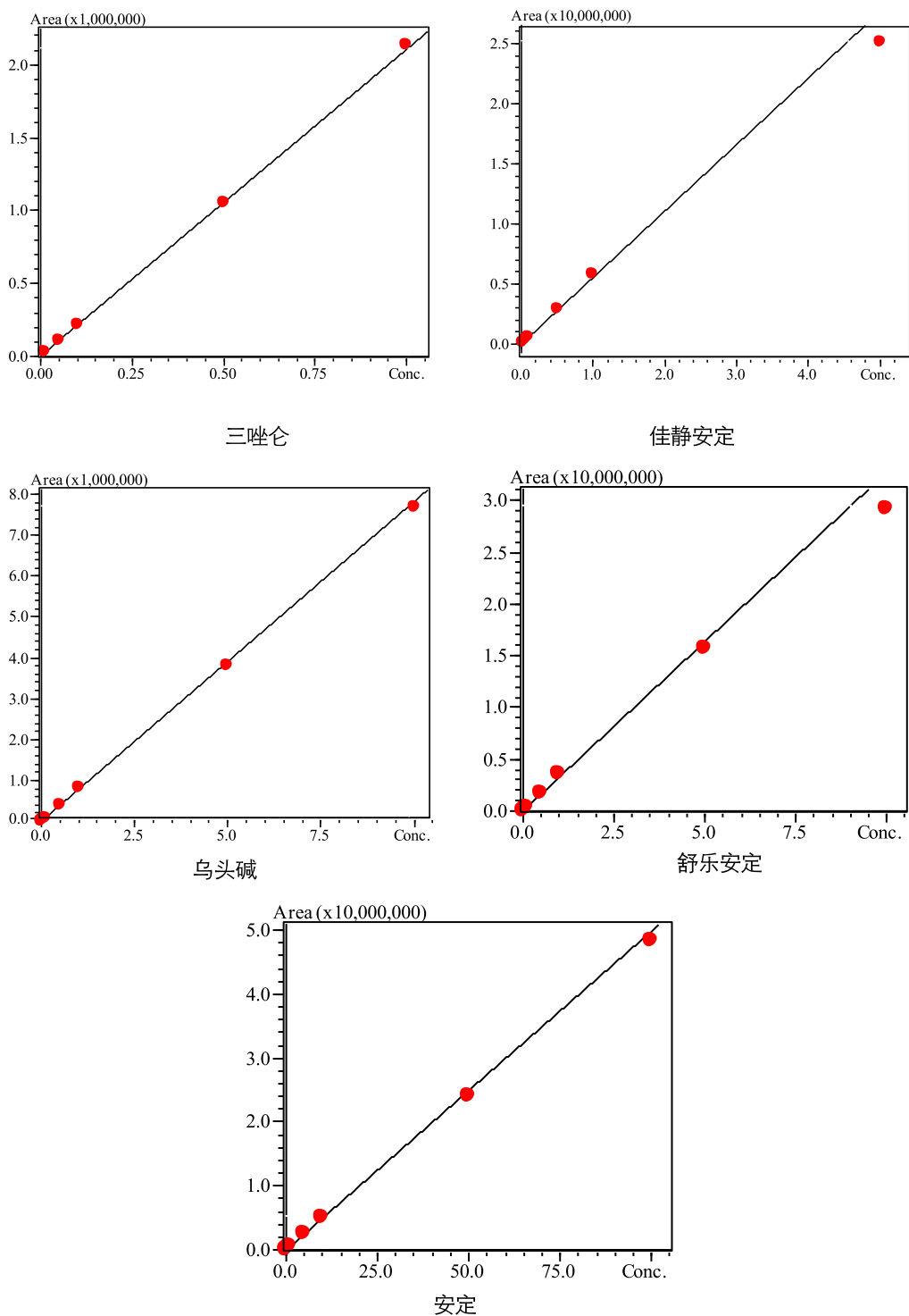


图 2 5 种毒物的校准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (μg/L)	r ²
1	三唑仑	$Y = (2.10109e+006)X + (4543.97)$	0.01~1	0.999
2	佳静安定	$Y = (5.52681e+006)X + (18095.5)$	0.01~5	0.997
3	乌头碱	$Y = (749929)X + (299.613)$	0.01~10	0.999
4	舒乐安定	$Y = (3.27458e+006)X + (19867.8)$	0.01~10	0.996
5	安定	$Y = (498999)X + (56.6132)$	0.01~100	0.999

2.3 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次, 考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示: 不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.008 %~0.116 % 和 0.50 %~7.42 %, 仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD% (0.05 μg/L)		RSD% (0.5 μg/L)		RSD% (5 μg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
三唑仑	0.057	4.56	0.033	0.57	0.015	0.82
佳静安定	0.053	2.60	0.035	0.98	0.011	0.50
乌头碱	0.051	7.42	0.040	2.69	0.017	1.17
舒乐安定	0.036	3.16	0.037	0.70	0.008	1.03
安定	0.054	6.70	0.024	2.33	0.011	0.78

2.4 灵敏度实验

根据各个化合物线性结果最低浓度测定的信噪比计算各个化合物的检出下限 (3 倍信噪比结果) 及定量下限 (10 倍信噪比结果), 得到各化合物的理论检出下限及理论定量下限如表 5 所示。

表 5 各化合物的理论检出下限及理论定量下限(n=6)

名称	浓度(μg/L)	S/N	理论检出下限 (μg/L)	理论定量下限 (μg/L)
三唑仑	0.01	71.73	0.0004	0.0014
佳静安定	0.01	89.58	0.0003	0.0011
乌头碱	0.01	52.15	0.0006	0.0019
舒乐安定	0.01	63.71	0.0005	0.0016
安定	0.01	23.59	0.0013	0.0042

2.5 实际样品检测结果

取 1 mL 血液, 添加 4 mL 乙腈, 涡旋 5 min 后, 4°C, 12000 r/min 离心 30 min 后取上清, 过滤后, 添加混合标准品配制得到浓度为 1 μg/L 的样品溶液, 重复检测 6 次的结果, 如表 6 所示。

表 6 血液添加样品检测结果(n=6)

样品名称	加标1 $\mu\text{g/L}$			
	Area	RSD%	Conc($\mu\text{g/L}$)	S/N
三唑仑	1,568,582	2.39	0.921	848.81
佳静安定	4,287,961	2.64	0.959	990.16
乌头碱	666,749	2.10	0.889	281.14
舒乐安定	2,501,019	2.16	0.894	576.01
安定	470,589	4.04	0.943	743.49

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定 5 种法医毒物分析中有代表性化合物的方法。该方法在分析速度快, 且线性范围宽, 校准曲线的相关系数良好。对 0.05 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 和 5 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验, 连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.008 %~0.116 % 和 0.50 %~6.70 % 之间, 系统精密度良好。