

ATLAS-USIS 结合岛津“药物毒物快速筛查方法包”对尿样中毒物进行高自动化快速筛查、定性及定量

LCMSMS-285

摘要：本文基于岛津“药物毒物快速筛查方法包”(Ver. 2)，将尿样用 ATLAS-USIS 自动前处理装置处理后，以岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8045 联用进行分析，实现了尿样中药物毒物的高自动化前处理和快速筛查、定性及半定量分析的有机结合，样品前处理和分析在 30 min 内即可全部完成。八种加标物质 Alprazolam、Amphetamine、Codeine、Methamphetamine、MDMA、Methomyl、Ketamine、Warfarin 均被筛查出；依据 MRM 同时触发产物离子扫描结果进行二级质谱库搜索，结果显示 8 种检出物的匹配度均在 73% 及以上，表明筛查结果可靠性良好；同时依据方法包内置的标准曲线得到了检出物的半定量分析结果。

关键词：ATLAS-USIS 药物毒物快速筛查方法包 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

随着经济社会的发展，药物滥用和非法使用毒品已成为一个严重的社会问题。各国政府已经采取了许多措施来打击吸毒、贩毒药物滥用等活动。

尿液、汗液、唾液及毛发等基质中的毒物药物检测是确认涉毒等案件的科学依据，其鉴定结果的准确性至关重要。考虑到可萃取检测基质的量、检测基质中毒品的浓度及可检查期间等，尿液是最合适的检测基质。通常尿液组成复杂，干扰成分多，因此分析尿液基质中的毒品往往必须进行一定的样品前处理。常见的前处理方法有固相萃取、固相微萃取、液-液萃取等，但是人工操作较为繁琐、费时，且成本较高。因此开发自动化程度高、快速、准确、高效的前处理方法具有重要意义。为此岛津公司 ATLAS-USIS 自动前处理装置应运而生，针对尿液、血液等样品中的毒物、兴奋剂等违禁药物可自动进行液-液萃取制备样品，复溶后可进行液质联用分析或气质联用分析，自动化程度高，大量节省人力物力。

为解决司法人员进行涉毒等相关案件处理时亟待解决的“是什么、有多少”的问题，岛津公司针对当前刑侦、法医、毒理等相关领域通常需要分析的化合物又适时推出“药物毒物快速筛查”方法包，该方法包使用简易定量法，以用于检测正离子的 Diazepam-d5 及用于检测负离子的 Phenobarbital-d5 作为内标，无需准备标准样品，即可进行 161 种药物、毒物的同时筛查、定性及半定量分析。其特点主要有：1) 提供分析解决方案：

方法包中包含方法文件及样品前处理方案，其中列出了质谱分析条件，液相色谱分析条件，各化合物保留时间信息，报告文件等，实验人员只需简单准备实验条件即可快速启动分析工作。由于这些分析方法已在实验室验证，因此可以显著减少分析方法开发所需的时间；2) 简化 LC-MS/MS 多组分同时分析时的分析流程：在进行 LC-MS/MS 分析时，必须对各化合物的质谱分析参数进行优化。由于方法包中已经包含了经过优化后的各化合物质谱分析参数，从而可大幅度减少参数优化所需的时间和精力；3) 提供优化后的同步检查扫描参数以用于筛查分析：通过方法包中的二级质谱数据库，可以对产物离子扫描结果进行相似度检索，进一步对疑似阳性化合物进行定性确证，确保检查结果的准确性；4) 轻松自定义方法文件：LabSolutions LCMS 可以轻松自定义方法文件，增加或减少待分析目标化合物。并且，该方法包中的分析参数列表可以用于针对待分析目标化合物创建特定的新方法文件。

本文利用岛津 ATLAS-USIS 自动前处理装置，结合岛津“药物毒物快速筛查方法包”(Ver. 2)，使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8045 联用，实现了尿样中 8 种毒物的高自动化前处理、快速筛查、定性及半定量分析。方法具有样品前处理自动化程度高、分析速度快、筛查结果可靠的特点，可用于 161 种药物、毒物的快速筛查、定性及半定量分析。

实验部分

1.1 仪器和试剂

本实验使用岛津 ATLAS-USIS 自动前处理装置及超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8045 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Phenomenex Kinetex XB-C18 (2.1 mm×100 mm L., 2.6 μm)

流动相: A 相 - 水 +0.1% 甲酸 +10 mM 甲酸铵,
B 相 - 甲醇 +0.1% 甲酸 +10 mM 甲酸铵

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 1 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
7.50	Pumps	Pump B Conc.	95
10.00	Pumps	Pump B Conc.	95
10.01	Pumps	Pump B Conc.	5
15.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI

加热气: 空气 10.0 L/min

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 300°C

D L 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见方法包

1.3 样品前处理方法

(1)ATLUS-USIS 自动前处理装置原理简介: 该装置针对尿液、血液等样品中的毒物等自动进行液-液萃取制备样品。其原理如图 1 所示: 向尿样中加入乙酸乙酯, 待检物被萃取。经离心、乳化检测后取出上清液可进行 GC/GC-MS 分析; 上清液进一步用盐酸处理, 蒸发烘干、复溶后可进行 LC-MS 分析。

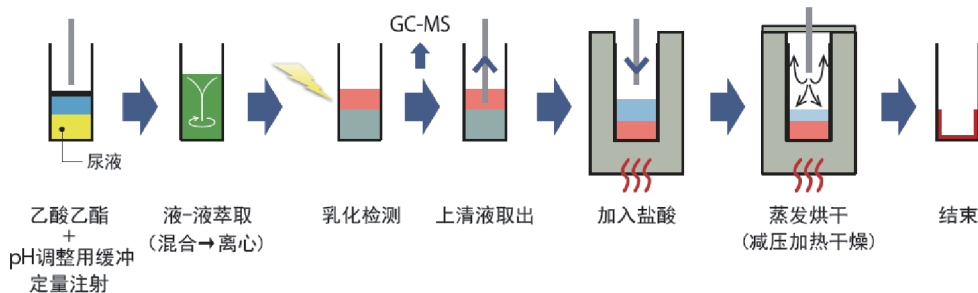


图1 ATLUS-USIS自动前处理装置原理示意图

(2) 样品处理：取准确体积的 Alprazolam、Amphetamine、Codeine、Methamphetamine、MDMA、Methomyl、Ketamine、Warfarin 及内标 Diazepam-d5 标样储备液 (0.1 mg/mL)，加到空白尿液中，配制得到浓度为 100 ng/mL 的基质加标溶液，用 ATLAS-USIS 自动前处理装置的 MainSeq 2 程序进行前处理，将前处理得到的样品用 1.5 mL 甲醇溶解，0.22 μ m 滤膜过滤后上机分析 (注：ATLAS-USIS 的 MainSeq 2 程序处理样品时，取 3 mL 尿样，用 4 mL 乙酸乙酯萃取，然后取 2 mL 上清液进行烘干处理，最后手动用移液枪取 1.5 mL 甲醇将烘干剩余物溶解)。

结果讨论

2.1 样品筛查结果

参照“药物毒物快速筛查方法包”中的方法 SSS_RapidTox Screening_Ver2.lcm 对样品按照上述 1.3 的前处理方法处理后进样分析，Alprazolam、Amphetamine、Codeine、Methamphetamine、MDMA、Methomyl、Ketamine、Warfarin 均被筛查出。MRM 色谱图如图 2 所示。

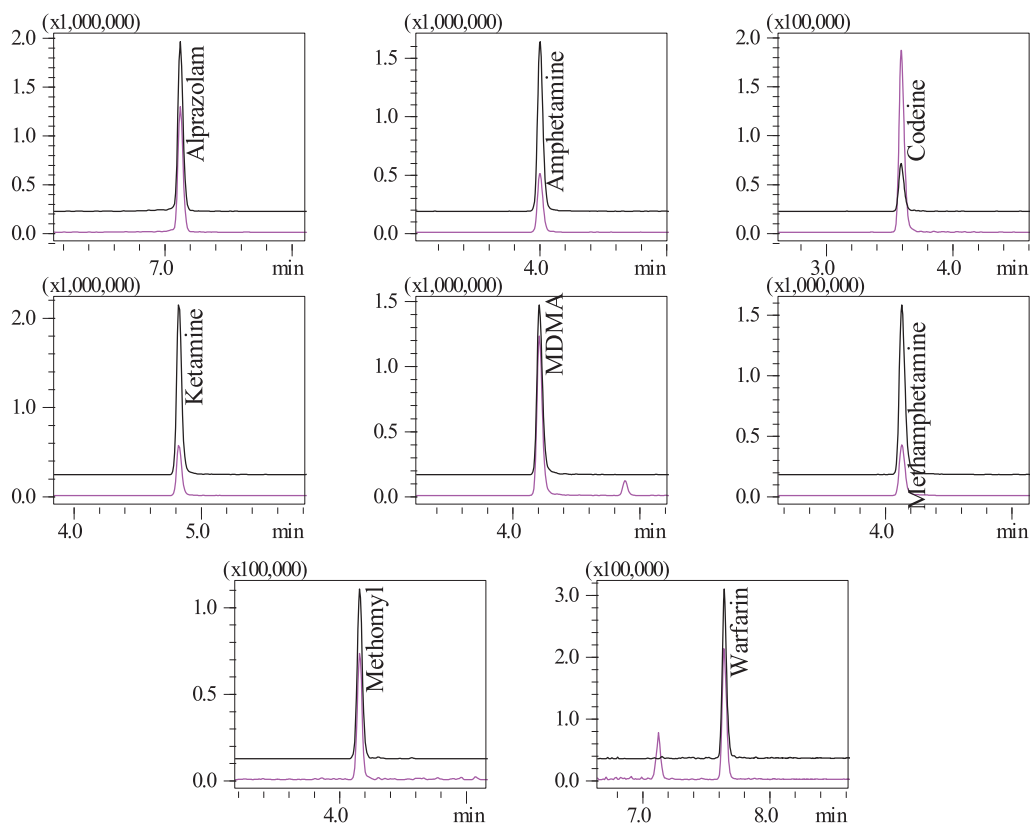


图2 检出化合物MRM色谱图

2.2 谱库搜索结果

“SSS_RapidTox Screening_Ver2.lcm”方法中包含触发产物离子扫描功能：当超过设定的筛查扫描阈值时，同步筛查扫描功能启动，可自动对检出化合物进行产物离子扫描，得到检出物的二级质谱并进行谱库搜索，得到匹配度，根据匹配度可对检出物进行进一步定性。本次分析得到的匹配度结果和搜库结果分别如表 2 和图 3~10(图中上部为目标化合物二级质谱，下部为谱库中相应化合物的标准二级质谱)所示。八种检出物的匹配度结果均在 73% 及以上，说明得到的筛查结果可靠性良好。

表2 谱库搜索匹配度结果表

编号	化合物	匹配度%
1	Alprazolam	92
2	Amphetamine	96
3	Codeine	73
4	Methamphetamine	96
5	MDMA	98
6	Methomyl	91
7	Ketamine	91
8	Warfarin	84

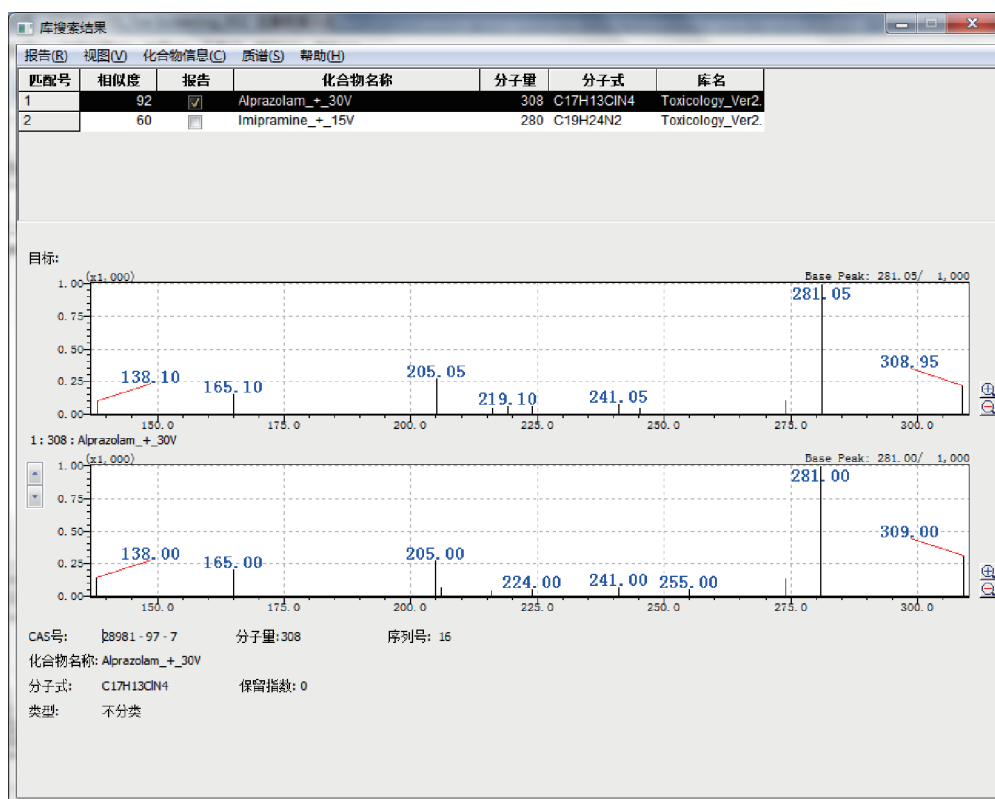


图3 Alprazolam二级质谱图(上)与库中二级质谱图(下)匹配情况

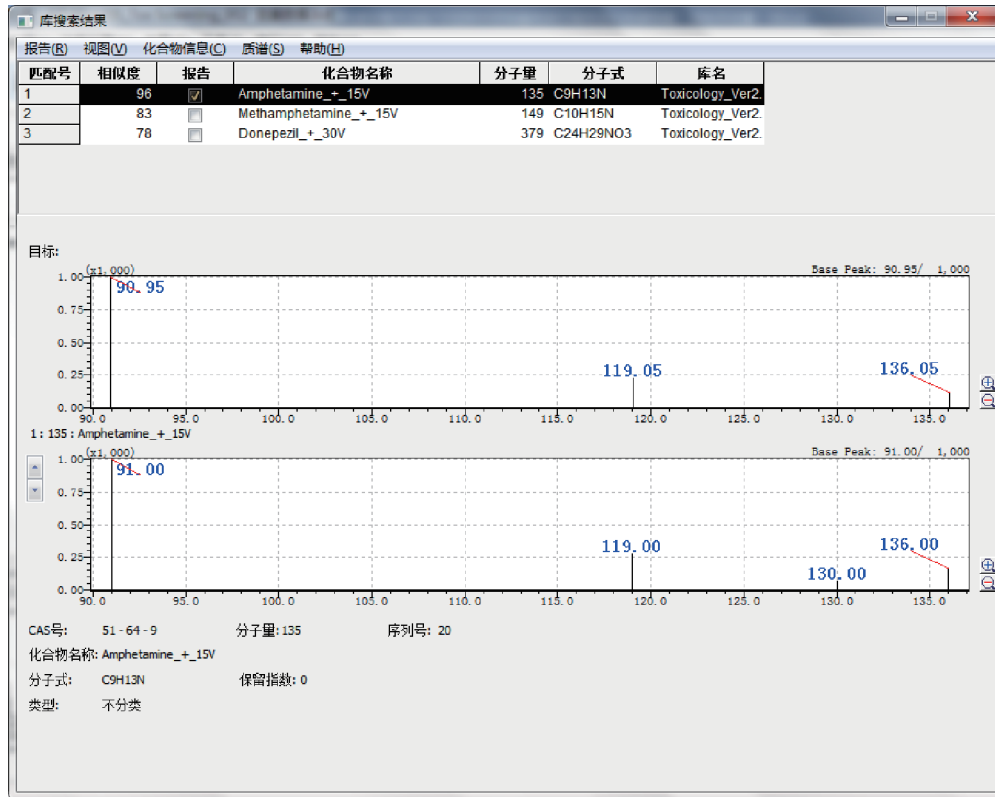


图4 Amphetamine二级质谱图(上)与库中二级质谱图(下)匹配情况

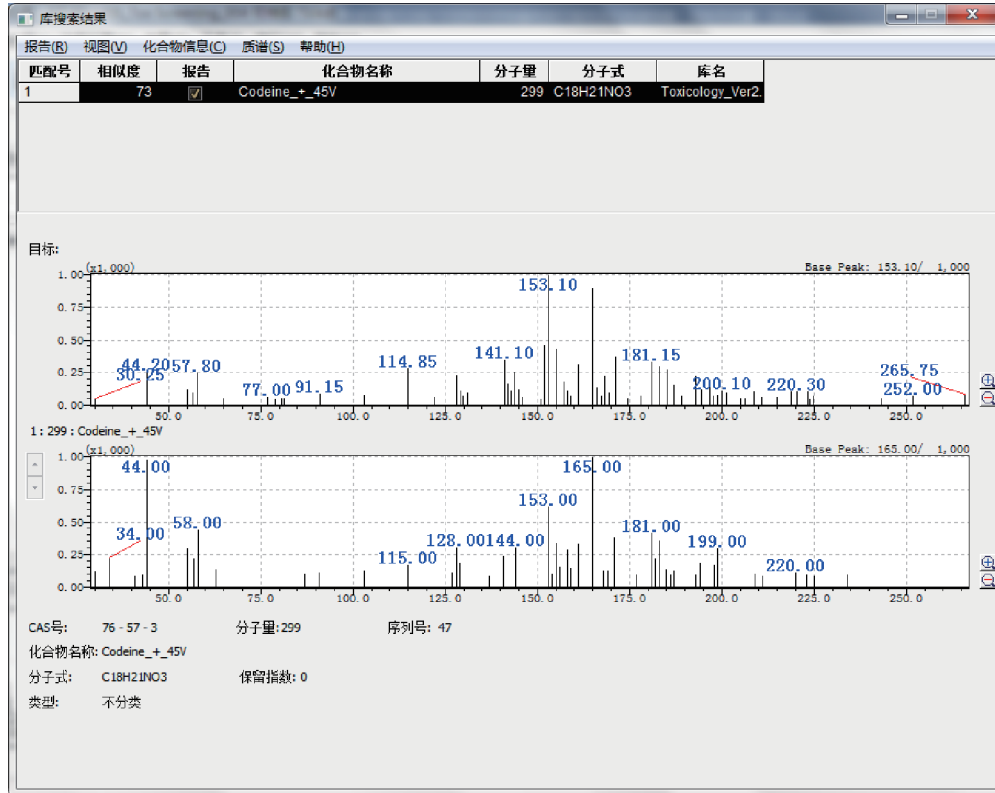


图5 Codeine二级质谱图(上)与库中二级质谱图(下)匹配情况

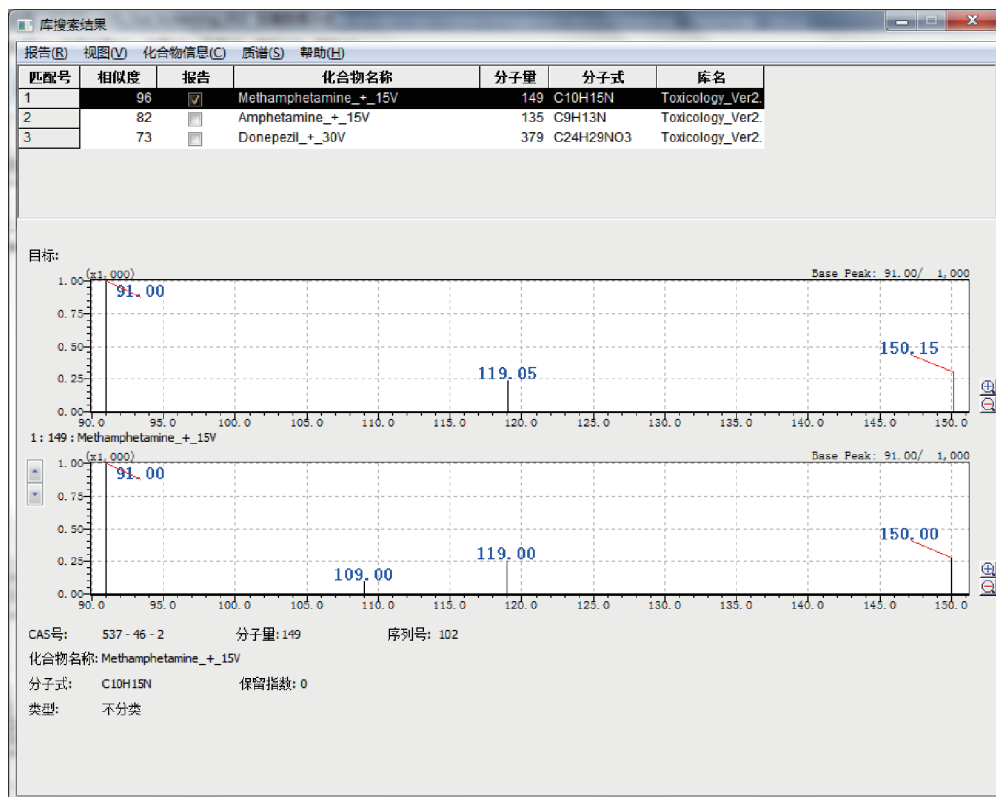


图6 Methamphetamine二级质谱图(上)与库中二级质谱图(下)匹配情况

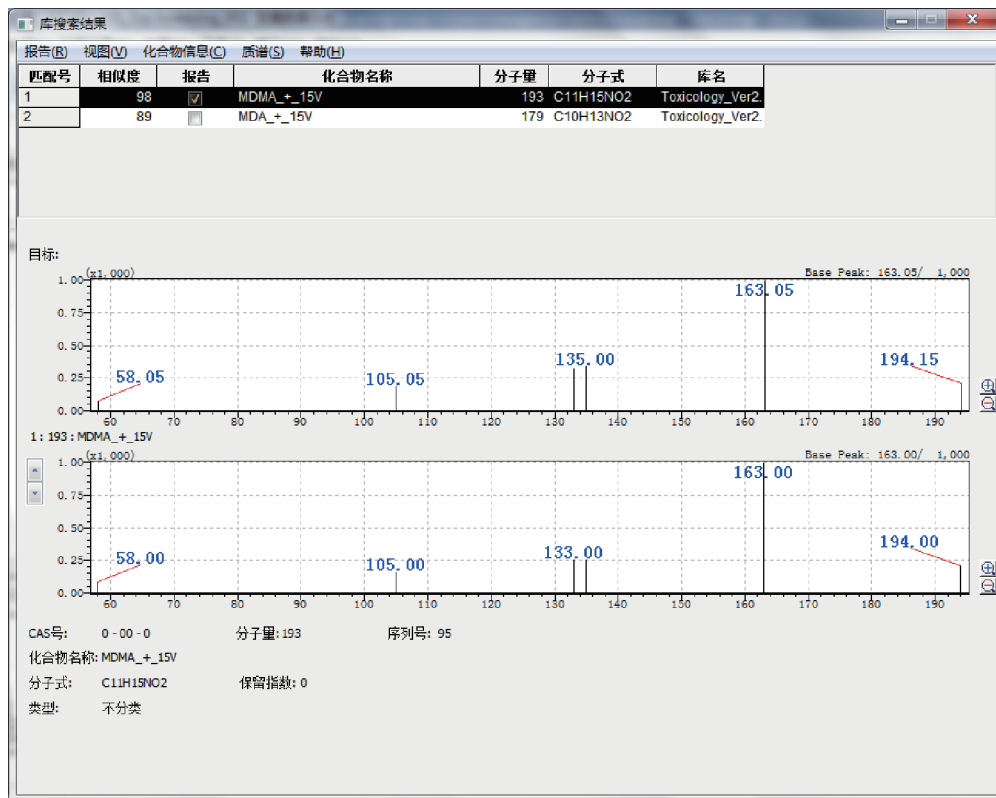


图7 MDMA二级质谱图(上)与库中二级质谱图(下)匹配情况

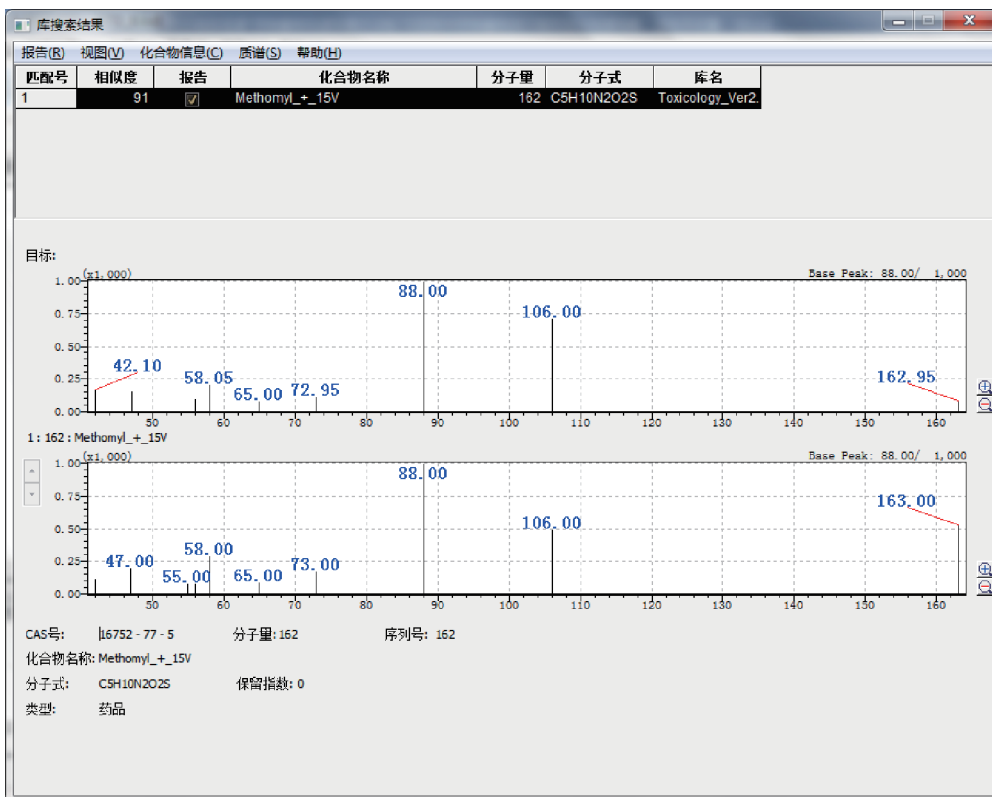


图8 Methomyl二级质谱图(上)与库中二级质谱图(下)匹配情况

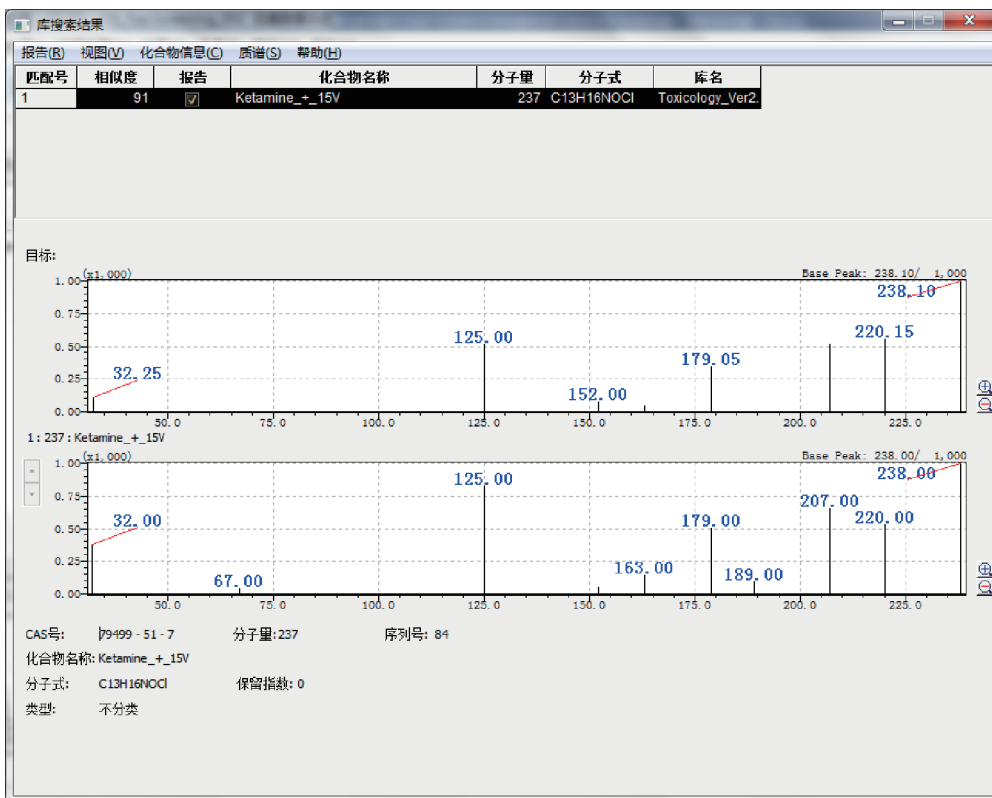


图9 Ketamine二级质谱图(上)与库中二级质谱图(下)匹配情况



图10 Warfarin二级质谱图(上)与库中二级质谱图(下)匹配情况

2.4 利用内标物半定量分析结果

方法包中方法储存了用于检测正离子的 Diazepam-d5 及用于检测负离子的 Phenobarbital-d5 作为内标的每一化合物的校准曲线，因此无需准备标准品即可进行半定量分析。通过该方法获得的半定量结果可供实验人员参考，如果需要获取精确的定量结果，则需要根据每个真正标准品进行的定量操作。在分析的同时如果选择报告输出功能，并加载方法包中附带的报告模板，则分析完成后可直接生成带定量结果的报告。

表3 各个化合物半定量分析结果表

编号	化合物	半定量结果 (ng/ μ L)
1	Alprazolam	0.119
2	Amphetamine	0.130
3	Codeine	0.109
4	Methamphetamine	0.092
5	MDMA	0.119
6	Methomyl	0.036
7	Ketamine	0.216
8	Warfarin	0.021

■ 结论

本文使用 ATLAS-USIS 自动前处理装置，基于岛津“药物毒物快速筛查方法包”(Ver. 2)，以岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8045 联用进行分析，实现了尿样中药物毒物的高自动化前处理和快速筛查、定性及半定量分析的有机结合。八种加标物质 Alprazolam、Amphetamine、Codeine、Methamphetamine、MDMA、Methomyl、Ketamine、Warfarin 均被筛查出；依据 MRM 同时触发产物离子扫描结果进行二级质谱库搜索，结果显示八种检出物的匹配度均在 73% 及以上，表明筛查结果可靠性良好；同时通过方法自带的简易定量法，在没有目标物标品的情况下得到各个检出物的半定量结果供相关人员参考。通过 ATLAS-USIS 自动前处理装置结合方法包，实现了样品前处理自动化，从样品处理到给出定性、定量结果只需 30 分钟左右时间，在一次分析中解决了毒物筛查过程中“是什么、有多少”的棘手问题。

附录：方法包中包含化合物清单

1	7-Aminoclonazepam	55	Diltiazem	109	Milnacipran
2	7-Aminoflunitrazepam	56	Diphenhydramine	110	Mirtazapine
3	7-Aminonimetazepam	57	Diprophyline	111	Morphine
4	7-Aminonitrazepam	58	Diquat	112	Mosapramine
5	8-Hydroxyetizolam (M-III)	59	Donepezil	113	Nemonapride
6	9-Hydroxyrisperidone	60	Dosulepin	114	Nicotine
7	Acetaminophen	61	Duloxetine	115	Nimetazepam
8	Acetylpheneturide	62	Ecgonine methyl ester	116	Nitrazepam
9	Aconitine	63	Ephedrine	117	Nortriptyline
10	Allylisopropylacetylurea	64	Escitalopram	118	Olanzapine
11	alpha-Hydroxyalprazolam	65	Estazolam	119	Oxazepam
12	alpha-Hydroxybrotizolam	66	Ethenzamide	120	Paliperidone
13	alpha-Hydroxymidazolam	67	Ethyl loflazepate	121	Paroxetine
14	alpha-Hydroxytriazolam	68	Etizolam	122	Pemoline
15	Alprazolam	69	Fenitrothion(MEP)	123	Pentazocine
16	Amitriptyline	70	Fludiazepam	124	Pentobarbital (neg)
17	Amobarbital (neg)	71	Flunitrazepam	125	Perospirone
18	Amoxapine	72	Flurazepam	126	Perphenazine
19	Amphetamine	73	Fluvoxamine	127	Phenobarbital (neg)
20	Aripiprazole	74	Gabapentin	128	Pimozide
21	Atropine	75	Glibenclamide	129	Pioglitazone
22	Barbital (neg)	76	Gliclazide	130	Primidone
23	Benzoyl ecgonine	77	Glimepiride	131	Promethazine
24	Biperiden	78	Haloperidol	132	Propericiazine
25	Blonanserin	79	Haloxazolam	133	Propofol (neg)
26	Bromazepam	80	Hydroxyzine	134	Quazepam
27	Bromocriptine	81	Ibuprofen	135	Quetiapine
28	Bromovalerylurea	82	Imipramine	136	Risperidone
29	Bromperidol	83	Ketamine	137	Ropivacaine
30	Brotizolam	84	Lamotrigine	138	Salicylic acid (neg)
31	Bupivacaine	85	Levetiracetam	139	Sertraline
32	Caffeine	86	Levomepromazine	140	Sildenafil
33	Carbamazepine	87	Lidocaine	141	Spiperone
34	Carpipramine	88	Lorazepam	142	Sulpiride
35	Chlordiazepoxide	89	Lormetazepam	143	Tadalafil
36	Chlorpheniramine	90	Loxoprofen (neg)	144	Tandospirone
37	Chlorpromazine	91	Malathion	145	Temazepam
38	Clobazam	92	Maprotiline	146	THC
39	Clocapramine	93	MDA	147	THC-COOH
40	Clomipramine	94	MDMA	148	Thiamylal (neg)
41	Clonazepam	95	Medazepam	149	Timiperone
42	Clotiazepam	96	Mefenamic acid	150	Tofisopam

43	Cloxazolam	97	Memantine	151	Topiramate
44	Clozapine	98	Mepivacaine	152	Trazodone
45	Cocaine	99	Mequitazine	153	Triazolam
46	Codeine	100	Metformin	154	Trihexyphenidyl
47	Colchicine	101	Methamphetamine	155	Vardenafil
48	Desipramine	102	Methomyl	156	Valproic Acid (neg)
49	Desmethylclotiazepam	103	Methylephedrine	157	Warfarin
50	Desmethyldiazepam	104	Methylphenidate	158	Zolpidem
51	Dextromethorphan	105	Mexazolam	159	Zopiclone
52	Diazepam	106	Mexiletine	160	Zopiclone-N-oxide
53	Diclofenac	107	Mianserin	161	Zotepine
54	Dihydrocodeine	108	Midazolam		

注：负离子模式在括号中进行了标注(neg)，其余采用正离子模式