

CLAM-2000 和 LC-MS/MS 联用测定尿样中的苯丙胺类毒品含量

LCMSMS-404

摘要： 本文使用岛津生物样本全自动在线前处理设备 CLAM-2000 和 LC-MS/MS 联用系统，建立了人尿样中 3 种苯丙胺类毒品的定量分析方法，整个实验流程不涉及手动前处理操作，从吸取样品、沉淀剂，到样品混匀、过滤，以及将处理完的样品输送到 LC-MS/MS 自动进样器均靠仪器自动完成，减少了人为误差，提高分析的准确度，适合尿样中苯丙胺类毒品的快速定量检测。本实验中基质标曲不同浓度点准确度在 92.8 ~ 109.9% 之间，不同浓度加标样品重复进样 6 次，保留时间 RSD 均小于 0.4%，峰面积 RSD 均小于 5%，质控样本实测浓度在允许波动范围内。

关键词： CLAM-2000 LC-MS/MS 尿样 苯丙胺类毒品

近年来毒品的滥用呈明显增长的趋势，其中苯丙胺类毒品属于最常见的毒品种类之一。它是一类人工合成的中枢神经兴奋剂，极易形成药物依赖性，对吸食者的危害主要体现在精神损害（如精神病样症状）和生理损害（导致急性心肌缺血和心律失常等，并有可能导致猝死）。苯丙胺类毒品主要包括苯丙胺，甲基苯丙胺，3,4-亚甲基二氧基苯丙胺和 3,4-亚甲基二氧基甲基苯丙胺等，在吸食者体内主要以原形形式经尿液排出，因此尿样中苯丙胺类含量的检测对于判断涉毒人员是否吸食过该类毒品至关重要。

蛋白质沉淀法是尿样等生物样品前处理时常用的

一种手段，其几乎适用于任何极性的小分子化合物且回收率较高。但是离线蛋白质沉淀法操作费时费力，操作人员频繁接触甲醇、乙腈、高氯酸等沉淀试剂和生物样品，具有潜在的生物危害风险。

岛津公司开发的 CLAM-2000 与 LC-MS/MS 联用系统，可利用 CLAM-2000 对全血、血浆、血清、尿液、唾液等生物样品自动进行蛋白质沉淀操作，然后将上清液自动传输至 LC-MS/MS 进行定量检测。

本文利用该系统建立了尿样中苯丙胺，甲基苯丙胺和 3,4-亚甲基二氧基甲基苯丙胺含量的检测方法，以供相关检测人员参考。



图 1 CLAM-2000 与 LC-MS/MS 联用系统

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 CLAM-2000 和 LC-MS/MS 联用系统，具体配置为：CLAM-2000 生物样本自动前处理仪，LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A_{SR} 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GIST C18, 2.1 mm I.D.×100 mm L., 2 μm

流动相: A 相 - 水 +0.1% 甲酸 +5mM 甲酸铵, B 相 - 甲醇 +0.1% 甲酸 +5mM 甲酸铵

流速: 0.40 mL/min

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始比例为 20%, 梯度时间程序见表 1

表 1 梯度时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	Pumps	Pump B Conc.	20
2.50	Pumps	Pump B Conc.	70
2.80	Pumps	Pump B Conc.	95
3.40	Pumps	Pump B Conc.	95
3.50	Pumps	Pump B Conc.	20
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(+)

接口电压: 4 kV

接口温度: 300°C

加热块温度: 400°C

MRM 参数: 见表 2

雾化气流量: 3.0 L/min

加热气流量: 10.0 L/min

DL 温度: 250°C

干燥气流量: 10.0 L/min

表 2 MRM 参数

ID	化合物名称	监测离子对	Q1 pre (V)	CE (V)	Q3 Pre (V)
1	苯丙胺 (AMP)	136.10>91.00*	-14.0	-17.0	-19.0
		136.10>119.10	-14.0	-15.0	-25.0
2	甲基苯丙胺 (MAMP)	150.10>91.00*	-18.0	-21.0	-36.0
		150.10>119.10	-18.0	-15.0	-24.0
3	3,4- 亚甲基二氧基甲基苯丙胺 (MDMA)	194.10>163.20*	-15.0	-13.0	-30.0
		194.10>105.10	-15.0	-15.0	-20.0

注: 带 “*” 表示定量离子对

1.3 CLAM-2000 自动前处理

在 CLAM-2000 控制软件界面 KIT.Cond 菜单的子菜单 protocol 项下, 编辑样品自动前处理程序, 具体步骤为:

- (1) 在过滤管中加入 20 μL 甲醇活化过滤管, 准备上样;
- (2) 吸取尿样 30 μL 上样;
- (3) 加入 120 μL 甲醇沉淀蛋白;
- (4) 2100 rpm 震荡 60 秒;
- (5) 抽滤 120 秒;
- (6) 样品转移至自动进样器进样 2 μL, 流程如图 2 所示。

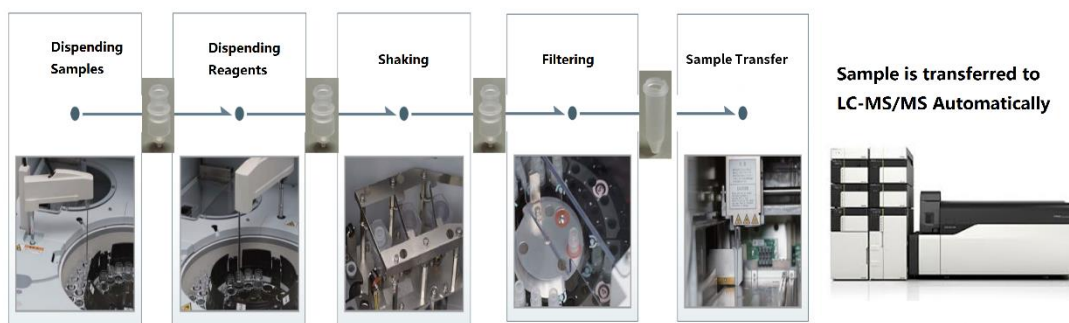


图 2 CLAM-2000 自动前处理流程

■ 结果与讨论

本实验采用岛津生物样本全自动在线前处理系统 CLAM-2000 进行尿样的前处理，样品处理结束后会自动将样品输送到 LC-MS/MS 的自动进样器单元进行进样分析。本文中样品自动前处理程序包括吸取样品、吸取蛋白沉淀剂、振摇和过滤，总时间约 5 min，在 LC-MS/MS 进行分析的同时，自动前处理程序也在同时进行，并且 CLAM-2000 会根据前处理流程同时处理 2-3 个样品，即对样品的处理进行到振摇这一步骤时，系统会自动开始序列中下一个样品的处理。这种交叉处理样本的行为使得每个样品的 LC-MS/MS 分析时间间隔为 5 min，如图 3 所示。



图 3 CLAM-2000 与 LC-MS/MS 联用工作模式

2.1 基质标准品色谱图

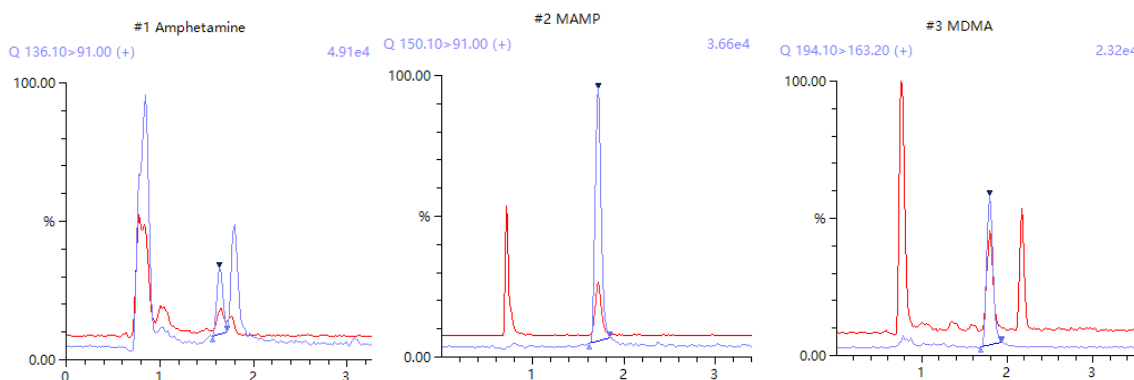


图 4 3 种苯丙胺类目标物色谱图 (浓度: 5.0 ng/mL, 左: AMP; 中: MAMP; 右: MDMA)

2.1 基质标准品色谱图

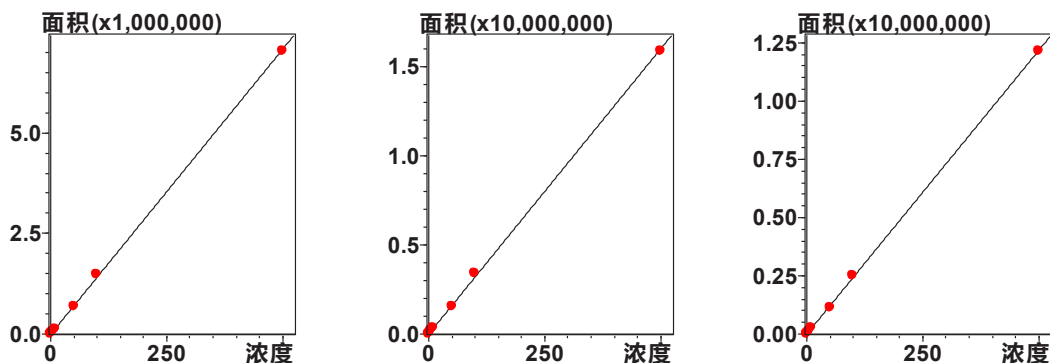


图 5 3 种苯丙胺类目标物校准曲线 (1~500 ng/mL, 左: AMP; 中: MAMP; 右: MDMA)

在空白尿样中添加目标物标准溶液, 依次配制成浓度分别为 1.0、2.0、5.0、10.0、50.0、100.0、500 ng/mL 的加标溶液, 按上述 1.3 处理流程处理样品后分析, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果如图 5 及表 3 所示

表 3. 校准曲线 (权重 1/C)

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	准确度 (%)
AMP	$Y = (14163.4)X - (5874.4)$	1.0~500	0.9998	93.7~109.9
MAMP	$Y = (31945.8)X + (2068.6)$	1.0~500	0.9996	92.8~106.2
MDMA	$Y = (24346.0)X - (81.5)$	1.0~500	0.9997	93.4~103.6

2.3 精密度实验

浓度为 5、50、500 ng/mL 的空白尿样加标样, 按照 1.3 的处理流程, 分别连续平行测定 6 次, 考察该系统的精密度, 结果如表 4 所示, 表明 CLAM-2000 自动前处理液质联用系统对目标物的分析方法精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

名称	浓度 (ng/mL)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
AMP	5	0.30	4.99
	50	0.26	3.76
	500	0.28	3.04
MAMP	5	0.27	4.24
	50	0.24	3.26
	500	0.27	2.14
MDMA	5	0.32	2.77
	50	0.24	2.03
	500	0.27	1.31

2.4 质控样品测试结果

空白样品中分别加入 5、50 和 500 ng/mL 标准样品作为质控样 QCL, QCM 和 QCH, 标示浓度和允许波动范围如表 5 所示, 实际检测浓度在允许波动范围内。

表 5 质控样品检测结果

化合物	标示浓度 (ng/mL)			允许波动范围 (ng/mL)			实测浓度 (ng/mL)		
	QCL	QCM	QCH	QCL	QCM	QCH	QCL	QCM	QCH
AMP	5	50	500	4-6	40-60	400-600	4.5	45.7	471.7
MAMP	5	50	500	4-6	40-60	400-600	4.8	48.2	491.3
MDMA	5	50	500	4-6	40-60	400-600	4.6	46.9	487.4

■ 结论

本文使用岛津全自动在线前处理设备 CLAM-2000 和 LC-MS/MS 在线联用系统，建立了人尿样中 3 种苯丙胺类毒品的定量分析方法，整个实验流程不涉及手动前处理操作，从吸取样品、沉淀剂，到样品混匀、过滤，以及将处理完的样品输送到 LC-MS/MS 自动进样器均靠仪器自动完成，减少了人为误差，提高分析的准确度，适合尿样中苯丙胺类毒品的快速定量检测。本实验中基质标曲不同浓度点准确度在 92.8 ~ 109.9% 之间，不同浓度加标样品重复进样 6 次，保留时间 RSD 均小于 0.4%，峰面积 RSD 均小于 5%，质控样本实测浓度在允许波动范围内。实验结果表明：该方法适合尿样中 3 种苯丙胺类毒品的快速定量检测。