

CLAM-2030 与 LCMS-8050 联用系统测定血液中的乙基葡萄糖醛酸苷

LCMSMS-761

摘要：本文参考《GA/T 1633-2019 法庭科学 血液、尿液中乙基葡萄糖醛酸苷检验 气相色谱 - 质谱和液相色谱 - 质谱法》建立了一种使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2030 和三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 测定血液中的乙基葡萄糖醛酸苷 (EtG) 的检测方法。实验结果表明,该方法检出限小于 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 基质校准曲线的线性范围为 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 准确度在 85.3%~106.3% 之间。重复性保留时间和峰面积 RSD% 分别在 0.07%~0.09% 和 1.99%~2.65% 之间。质控样品的平均回收率在 101.3~117.4% 之间, RSD% 在 1.77~4.31% 之间, 满足标准的相关要求, 适合血液中乙基葡萄糖醛酸苷的液相色谱 - 质谱法检测。

关键词：乙基葡萄糖醛酸苷 CLAM-2030 血液 GA/T 1633-2019

技术特点：

- ❖ 自动前处理仪 CLAM-2030 与 LCMS/MS 在线联用, 无需手动操作, 前处理简单方便。
- ❖ 满足标准 GA/T 1633-2019 中的相关要求。

乙基葡萄糖醛酸苷 (Ethyl Glucuronide, EtG) 是乙醇在人体内代谢的标志性代谢物。相较于乙醇, 其在血液中存在时间更长, 通常情况下, EtG 在血液中的存在时间约为 12 h, 血液中 EtG 检测结果是判定个体在 12 h 内是否饮酒的重要证据。此外, 血液中 EtG 的测定, 对判定乙醇来源、区分是否血液腐败产生乙醇有着重要的意义。

EtG 的检测方法有 LC-MS/MS 和 GC-MS/MS 等, GC-MS/MS 检测时, 需要对 EtG 进行衍生, 前处理较为

复杂, 而用 LC-MS/MS 检测 EtG 则不需要衍生。

岛津开发的 CLAM-2030 与 LC-MS/MS 联用系统, 可对全血、血浆、血清、尿液、唾液等生物样品自动进行蛋白沉淀操作, 然后将上清液自动传输至 LC-MS/MS 进行定量检测。本文使用该联用系统, 参考《GA/T 1633-2019 法庭科学 血液、尿液中乙基葡萄糖醛酸苷检验 气相色谱 - 质谱和液相色谱 - 质谱法》, 建立了血液中 EtG 的 LC-MS/MS 分析方法。该方法前处理简单, 灵敏度和准确度高, 适合血液中的 EtG 检测方法。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2030 和岛津质谱 LCMS-8050, 具体配置如下:

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{SR}
输液泵：	LC-30AD×2	自动进样器：	SIL-30AC
柱温箱：	CTO-20A	质谱仪：	LCMS-8050
前处理模块：	CLAM-2030	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.93



图 1 CLAM-2030+LCMS-8050 联用系统

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter C18-120 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μ m, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N:227-31012-05)
 流 动 相 : A-0.01% 甲酸 - 水溶液; B- 甲醇溶液
 进 样 体 积 : 1 μ L 柱 温 : 40°C
 流 速 : 0.3 mL/min 洗 针 液 : 甲醇 / 水 = 1:1 (v:v)
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 7%, 时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
1.00	泵	B Conc	7
2.00	泵	B Conc	60
3.00	泵	B Conc	60
3.10	泵	B Conc	7
6.00	控制器	STOP	

质谱条件

离子化模式 : ESI(-) 加热模块温度 : 400°C
 加热气流速 : 空气 10.0 L/min 接 口 温 度 : 300°C
 雾化气流速 : 氮气 3.0 L/min D L 温 度 : 250°C
 干燥气流速 : 氮气 10.0 L/min 接 口 电 压 : -2 kV
 扫 描 模 式 : 多反应监测 (MRM) MRM 参 数 : 见表 2

表 2 15 种卡西酮类新精神活性物质和内标的 MRM 参数

序号	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
1	乙基葡萄糖醛酸苷	221.15	74.95*	17.0	22.0	27.0
			85.00	13.0	27.0	24.0

* 代表定量离子对。

1.3 校准曲线溶液配制

取 EtG 对照品储备液 (100 μ g/mL), 用乙腈逐级稀释, 分别得到 0.5, 1, 2, 5, 10, 50 和 100 μ g/mL 的标准工作溶液。分别取各浓度的标准工作溶液 100 μ L, 加入 900 μ L 空白血液得到浓度分别为 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 和 10 μ g/mL 基质校准曲线溶液。

1.4 样品前处理

在 CLAM-2030 工作站界面优化自动前处理参数、蛋白沉淀剂使用量、震荡转速、震荡时间、抽滤时间等。确定样品自动前处理程序具体操作为:

- (1) 吸取 20 μ L 甲醇活化过滤管, 准备上样;
- (2) 吸取基质校准曲线溶液或血液样品 50 μ L 上样;
- (3) 吸取水 50 μ L 稀释样品;
- (3) 吸取样本提取剂 250 μ L;
- (4) 转速 3000 rpm 震荡 90 s 进行提取;
- (5) 使用 -50~-60 kPa 的负压抽滤过滤管 60 s;
- (6) 接收管转移至自动进样器, 进样 1 μ L (详见图 2)。

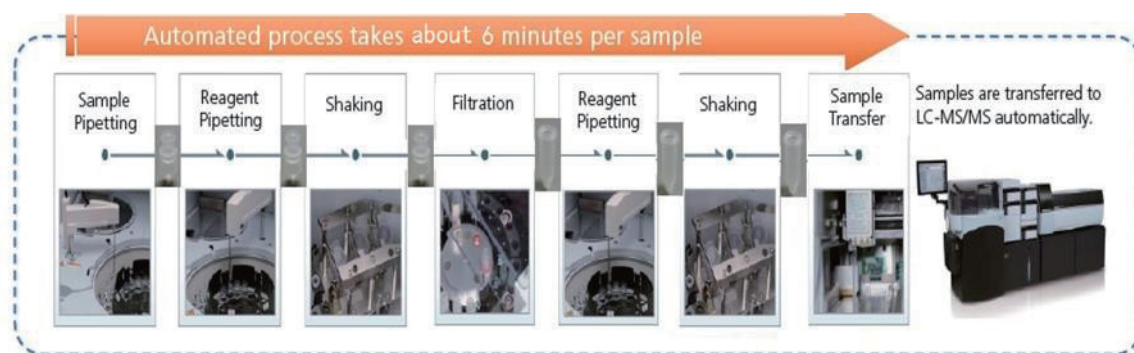


图 2 CLAM-2030 在线自动前处理过程

■ 结果与讨论

2.1 检出限和定量限溶液 MRM 色谱图

按 1.2 中的分析条件进行测定，0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的检出限溶液色谱图的 S/N 大于 3，0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 定量限溶液色谱图的 S/N 大于 10，灵敏度良好，符合定量要求。检出限和定量限溶液的 MRM 色谱图如下图 3 所示。

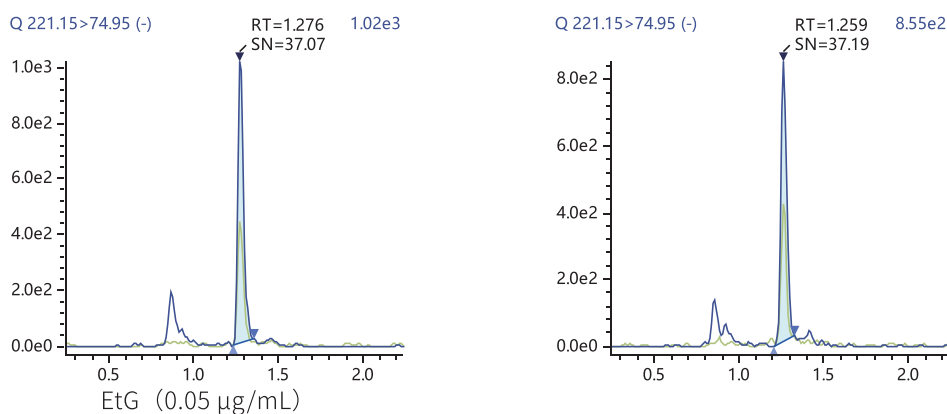


图 3 EtG 检出限和定量限溶液 MRM 色谱图 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

2.2 校准曲线

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法绘制校准曲线，所得校准曲线线性范围为 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，线性关系良好，相关系数大于 0.999，准确度在 85.3%~106.3% 之间，校准曲线如下图 4 所示。

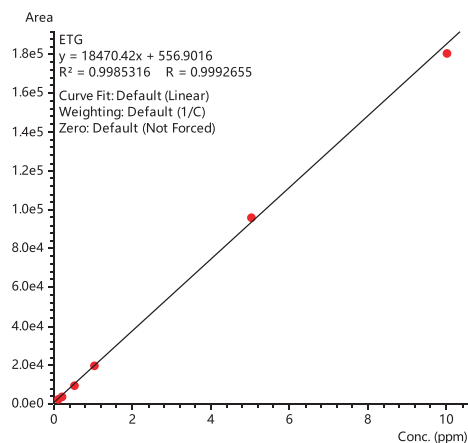


图 4 EtG 校准曲线

2.3 精密度实验

按 1.2 中的分析条件进行测定，选择低中高三个浓度对照品溶液，分别连续进样测定 4 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的相对标准偏差如表 3 所示，RSD% 分别在 0.07 %~0.09% 和 1.99%~2.65% 之间，实验结果表明，该分析方法具有良好的精密度。

表 3 保留时间和峰面积精密度结果 (n=4)

序号	浓度 (µg/mL)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
1	0.1	0.09	2.65
2	1	0.07	2.16
3	10	0.07	1.99

2.4 回收率

向空白血液中添加 EtG 标准品溶液，配制成浓度为 0.1, 1 和 10 µg/mL 的样品加标溶液，每个水平重复测定 3 次，加标样品的准确度和精密度结果如表 4 所示，平均回收率在 101.3~117.4% 之间，RSD% 在 1.77~4.31% 之间。

表 4 方法回收率结果 (n=3)

序号	加标浓度 (µg/mL)	回收率 (RSD%)	相对标准偏差 (RSD%)
1	0.1	105.0	4.31
2	1	117.4	1.43
3	10	101.3	1.77

■ 结论

本文建立了一种使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2030 和三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 测定血液中 EtG 的方法。此联用系统从吸取样品、沉淀剂，到样品混匀、过滤以及将处理完的样品输送到 LCMS/MS 自动进样器，全部仪器自动完成。不涉及手动前处理操作，减小了人为误差，提高分析的准确度。本实验中检出限小于 0.05 µg/mL，基质校准曲线的线性范围为 0.1~10 µg/mL，准确度在 85.3%~106.3% 之间，方法灵敏度和准确度高，适合血液中乙基葡萄糖醛酸苷的检测，可供公安司法领域检测人员参考。

岛津应用云

