

# Application News

SSI-LCMS-101

液相色谱质谱法

## 全自动化样品前处理系统与LC-MS/MS

### 联用分析尸检样品



#### ■ 摘要

使用全集成、自动化样品制备模块与LCMS系统联用，开发了一种更快、更准确、可重复的尸检样品分析方法。

#### ■ 背景

目前，法医实验室所采用的包括SPE或LLE在内的样品前处理方法不仅耗时，而且在多步骤的样品处理过程中会引入人为误差。自动化样品前处理方法提供了更可重现的解决方案，可消除手动前处理过程中引入的人为误差，并提高实验室的安全性。临床实验室自动化模块（CLAM）系列旨在满足这些需求，并提供可提高实验室效率的解决方案。

#### ■ 方法

采用购自Restek Corporation（宾夕法尼亚州贝尔福特）和Cerilliant Corporation（德克萨斯州圆石城）的15种药物标准品，在岛津LCMS-8060三重四极杆质谱上建立了LC-MS/MS分析方法。四种氘代内标（阿普唑仑-D5、吗啡-D3、氢可酮-D3和delta-9-THC-D3）均购自Cerilliant Corporation。

将四种内标利用甲醇配制成内标工作液，其中阿普唑仑-D5、吗啡-D3和氢可酮-D3的最终浓度为100 ng/mL，delta-9-THC-D3的最终浓度为10 ng/mL。将15种药物标准品溶解在甲醇中，配制成10 µg/mL的储备溶液。利用空白人全血将以上储备液依次稀释至10, 50, 100, 500和1000 ng/mL的浓度。

该应用使用尸检人全血样品、人体脾脏组织、人脑组织和加标全血样品。在利用CLAM-2000进行样品制备前，按照1:4的稀释比例，将组织样本进行均质化处理。设置CLAM-2000样品前处理程序，首先分别向各个样品处理管中添加20µL蒸馏水，然后分别加入10µL样品。之后，使用100µL 50/50的甲醇/乙腈溶液进行蛋白质沉淀。将以上混合物在CLAM-2000系统中以1900 rpm的速度涡旋处理30秒。接着向该混合物中添加20µL内标溶液，然后再振荡30秒。经过60秒过滤后，进行样品收集并自动将其转移至LCMS-8060系统中。

将Restek公司的Raptor Biphenyl液相色谱柱(100 x 2.1mm x 2.7 $\mu$ m)与EDX Direct保护柱套和Raptor Biphenyl保护柱滤芯联合使用。使用.1%甲酸和5mM甲酸铵水溶液以及0.1%甲酸和5mM甲醇溶液作为流动相进行12分钟的线性梯度洗脱。梯度如表1所示。将柱温设置为30°C, 进样量为2 $\mu$ L。

时间 (分钟)	%B
0	5
9	100
10	100
10.01	5
12	结束

表1: LC梯度条件

在ESI源正离子模式下, 利用多反应监测 (MRM) 在LCMS-8060进行分析。每种分析物和内标MRM通道信息如表2所示。LCMS-8060的质谱条件如表3所示。

分析物	前体离子	产物离子 (数量)	产物离子 (质量)
吗啡-D3	289.2	152.1	
吗啡	286.2	152.1	165.0
氢吗啡酮	286.2	185.0	128.0
可待因	300.2	165.1	152.0
6-AM	328.2	165.0	211.0
氢可酮-D3	303.1	199.0	
氢可酮	300.1	199.0	128.0
7-氨基氯硝安定	286.1	121.2	195.0
芬太尼	337.3	188.0	105.1
丁丙诺啡	468.3	55.1	396.0
氯羟去甲安定	321.1	275.0	229.0
氯硝安定	316.1	270.0	214.1
去甲西洋	271.0	140.0	165.0
阿普唑仑-D5	314.1	286.0	
阿普唑仑	309.1	281.0	205.0
THC-COOH	345.0	299.2	193.2
THC-d3	318.0	196.0	
delta-9-THC	315.2	193.0	259.0
THC-OH	331.0	193.0	201.0

表2: MRM通道参数

LCMS-8060 质谱仪条件	
雾化气流量	2 L/min
干燥气流量	10 L/min
加热气体流量	10 L/min
DL温度	250°C
加热模块温度	400°C
接口温度	300°C
离子源	加热ESI +

表3: MS设置条件

## ■ 结果和讨论

使用CLAM-LCMS-8060系统共分析了七个尸检样本, 每个样本重复分析3次。发现所有七个样本均具有出色的重现性和良好的相关性。每个样本的%RSD 均小于10%, 但脾脏样品除外, 其%RSD为17% (表4)。

15种分析物的标准曲线如图2和图3所示。每个标曲样品分别三次重复进样, 所有曲线的线性回归值  $r^2 \geq 0.997$ 。这些尸检样品可手动制备, 并可在三重四级杆液质联用系统 (LCMS) 中进行分析, 这些尸检样本在利用CLAM-LCMS-8060进行自动分析前, 也利用手动前处理方法处理了这些样本, 并用LCMS三重四级杆质谱进行离线分析。

将CLAM-2000自动前处理方法和手动前处理方法进行了对比, 对比结果汇总在表4中。自动前处理方法将样品制备时间由2个多小时缩短为5分钟, 从而加快了样品处理量 (参见图4)。此外, CLAM-2000系统可同时处理四份样品, 进一步提高了样品通量。

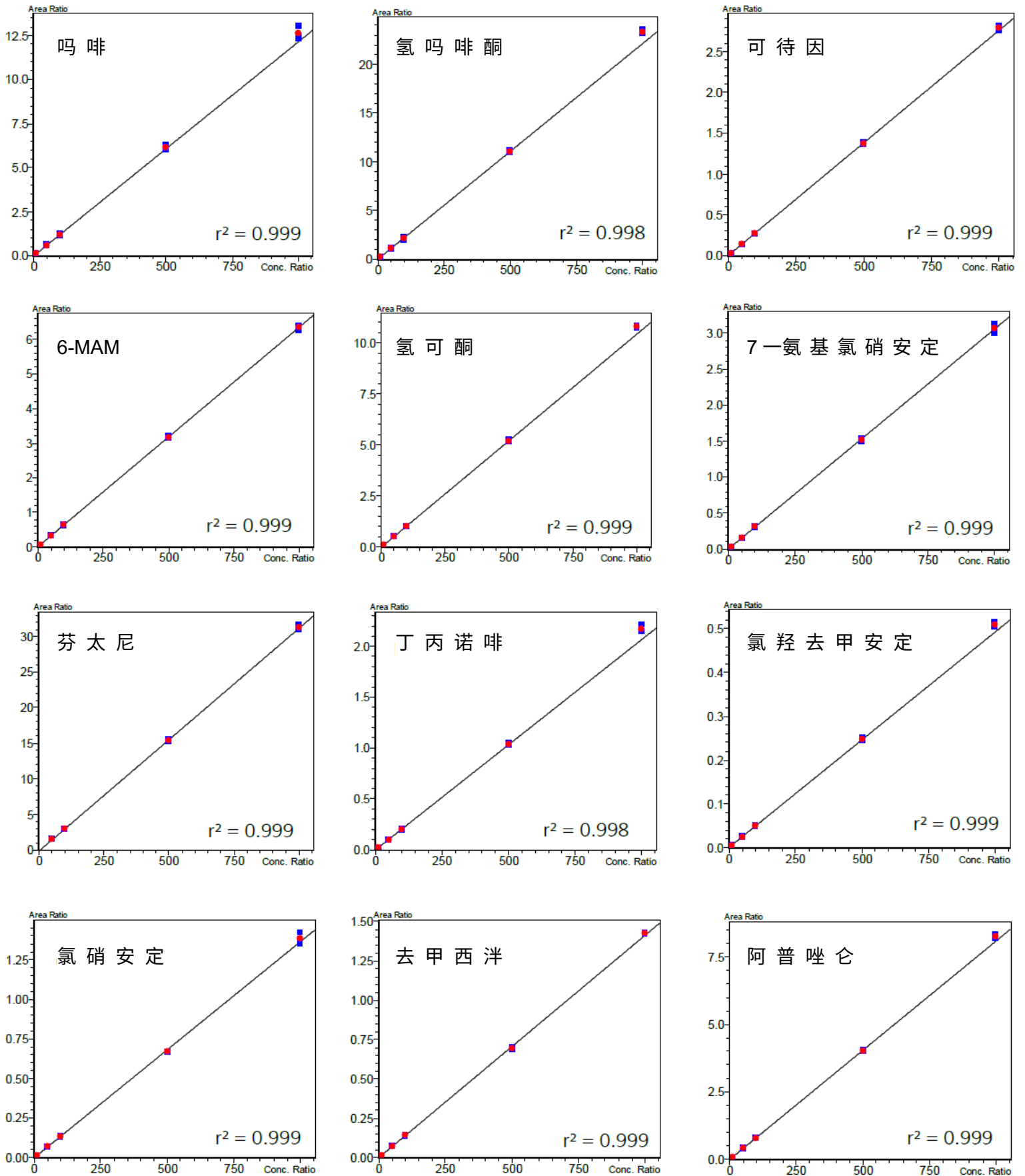


图 2: 测定的 15 种分析物中 12 种的标准曲线。

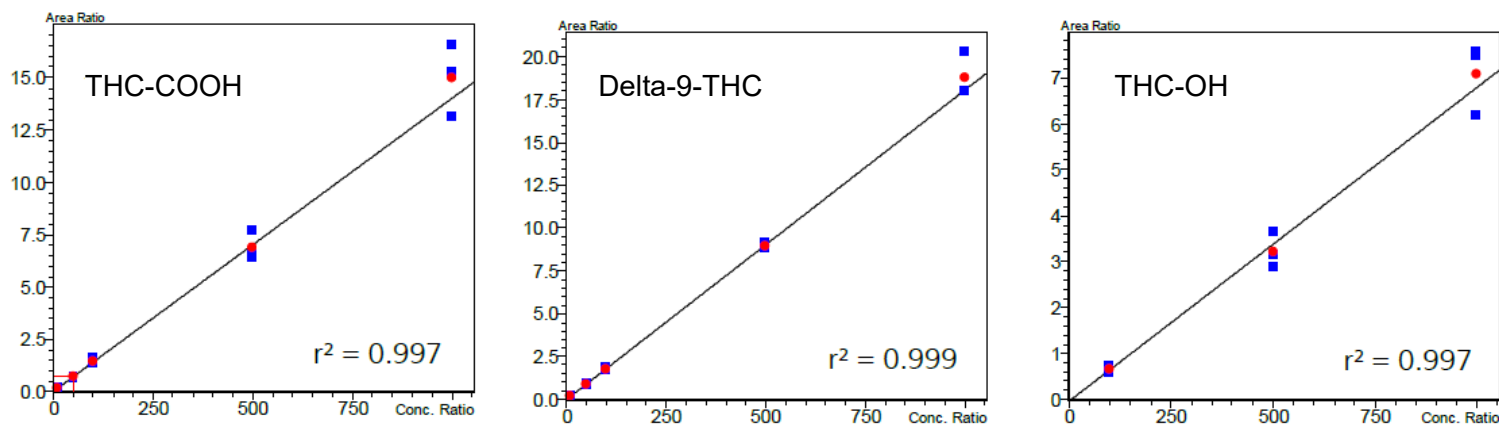
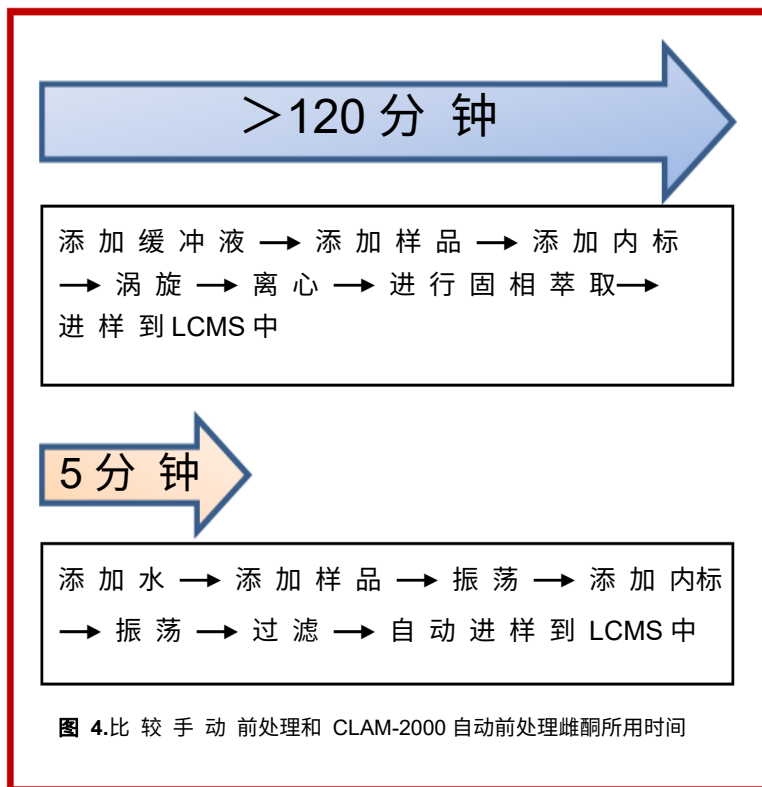


图 3: 剩余 3 种 THC 分析物的标准曲线。

样品ID	死后样本	发现药物超出 10 ng/mL 截止值	手动前处理结果 (ng/mL)	CLAM-2000和 LCMS-8060联合 自动前处理结果 (ng/mL)			% RSD	手动前处理和 CLAM 自动前处理 之间的平均差异 %
				重复1	重复2	重复3		
A	心脏血	吗啡	400	446.1	445.4	442.1	<b>0.476</b>	11%
		可待因	19	22.3	20.9	21.2	<b>3.478</b>	13%
		阿普唑仑	593	557.9	558.1	557.7	<b>0.043</b>	-6%
B	胸腔血	吗啡	363	373.0	365.1	369.7	<b>1.071</b>	2%
		可待因	31	31.9	32.3	33.2	<b>1.952</b>	5%
		去甲西洋	135	154.8	149.5	156.2	<b>2.317</b>	14%
C	股骨血	氢可酮	177	175.9	177.9	174.2	<b>1.048</b>	-1%
		氢吗啡酮	30	30.3	29.9	30.8	<b>1.438</b>	1%
D	心脏血	7-氨基氯硝安定	72	48.5	47.7	46.4	<b>2.147</b>	-34%
E	心脏血	THC-COOH	已检测到*	42.2	42.3	49.9	<b>9.937</b>	不适用
F	脾脏** (ng/g) 匀浆 稀释因子 = 5	吗啡	493	493.7	457.1	347.7	<b>17.551</b>	-12%
G	大脑** (ng/g) 匀浆 稀释因子 = 5	吗啡	147	169.7	168.9	176.6	<b>2.460</b>	17%

表 4: 比较手动前处理方法和 CLAM-2000 自动前处理的结果



### ■ 结论

CLAM-2000全自动前处理系统与岛津LCMS联用,可提供一种全新的分析方法,无需手动操作,即可分析生物样品中的药物。由于样品前处理和样品分析同时重叠进行,所以该方法大大提高了样本分析通量,使得分析人员有时间执行其他任务。和标准手动制备方法相比,该自动化样品制备方法可使药物分析的RSD控制在10%以内。

### ■ 致谢

我们对得克萨斯大学西南医学院的Ruth Gordillo和塔兰特县法医检验中心的积极参与以及Restek公司提供色谱柱表示衷心的感谢。



岛津企业管理(中国)有限公司  
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考,不予任何保证。  
如有变动,恕不另行通知。