

ATLAS-USIS 结合岛津“药物毒物快速筛查方法包”对全血样品中毒品进行高自动化快速筛查、定性及半定量分析

LCMSMS-336

摘要：本文基于岛津“药物毒物快速筛查方法包”(Ver. 2)，将全血样品稀释后用 ATLAS-USIS 自动前处理装置处理，以岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8045 联用系统进行分析，实现了全血样品中毒品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，样品前处理及上机分析可在 30 min 内完成。十种加标物质 Alprazolam、Amphetamine、Chlordiazepoxide、Chlorpromazine、Codeine、Estazolam、Ketamine、Lidocaine、Methamphetamine、MDMA 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，结果显示十种检出物的匹配度均在 70% 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 三重四极杆质谱 全血样品

当前药物滥用和非法使用毒品已成为一个严重的社会问题，血液是涉毒案件中常用的一种生物检材，其中毒物药物的准确检测是确认涉毒案件的科学依据。血液组成复杂，干扰成分多，分析血液基质中的毒品必须进行一定的样品前处理。液-液萃取是一种常见的处理方法，但人工操作繁琐、费时、费力，且涉毒血液中的未知成分可能对操作人员造成潜在的生物危害。因此开发自动化程度高、快速且生物安全性高的前处理方式具有重要意义。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，整个处理过程在密闭的环境中进行，可有效避免污染，降低操作者的感染风险。样品处理结束，复溶后即可进行液质联用分析或气质联用分析，自动化程度高，平行性好，大

量节省人力物力。

同时针对当前刑侦、法医、毒理等相关领域通常需要分析的化合物，岛津公司又适时推出“药物毒物快速筛查”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，只需准备两种内标，无需准备标准样品，即可进行 161 种药物、毒物的同时筛查、定性和半定量分析。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，实现了全血样品中十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，可为司法刑侦领域人员提供参考。

实验部分

1.1 仪器

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

DL 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

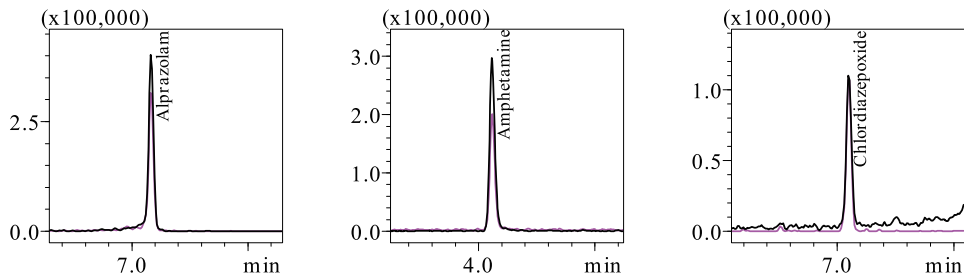
取准确体积的 Alprazolam、Amphetamine、Chlordiazepoxide、Chlorpromazine、Codeine、Estazolam、Ketamine、Lidocaine、Methamphetamine、MDMA 及内标 Diazepam-d5 标样储备液 (0.1 mg/mL), 加到空白全血样品中 (由于全血样品粘度较大, 考虑到萃取效果等所用全血样品为超纯水 4 倍稀释后样品), 配制得到浓度为 100 ng/mL 的加标样品, 用 ATLAS-USIS 自动前处理装置的 Main.Seq 2 程序进行前处理, 将前处理得到的样品用 2 mL 初始流动相溶解, 0.22 μm 滤膜过滤后上机分析 (注: ATLAS-USIS 的 MainSeq 2 程序处理样品时, 取 2 mL 全血稀释样品, 用 3 mL 乙酸乙酯萃取, 然后取 2 mL 上清液进行干燥处理, 最后手动用移液枪取 2 mL 初始流动相将干燥剩余物溶解)。

■ 结果与讨论

2.1 样品筛查结果

方法包中提供了完整的液质分析解决方案: 1) 方法包中包含的方法文件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, 由于这些分析方法已在实验室验证, 因此可显著减少分析方法开发所需的时间; 2) 方法包中包含经过优化后的各化合物质谱分析参数, 可大幅度减少参数优化所需的时间和精力。实际工作中实验人员用 ATLAS-USIS 自动前处理装置处理好样品后, 只需按方法包中列出条件简单准备流动相、色谱柱等实验条件即可快速启动分析工作。

本应用例参照“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、Chlordiazepoxide、Chlorpromazine、Codeine、Estazolam、Ketamine、Lidocaine、Methamphetamine、MDMA 均被筛查出。MRM 色谱图如图 1 所示。



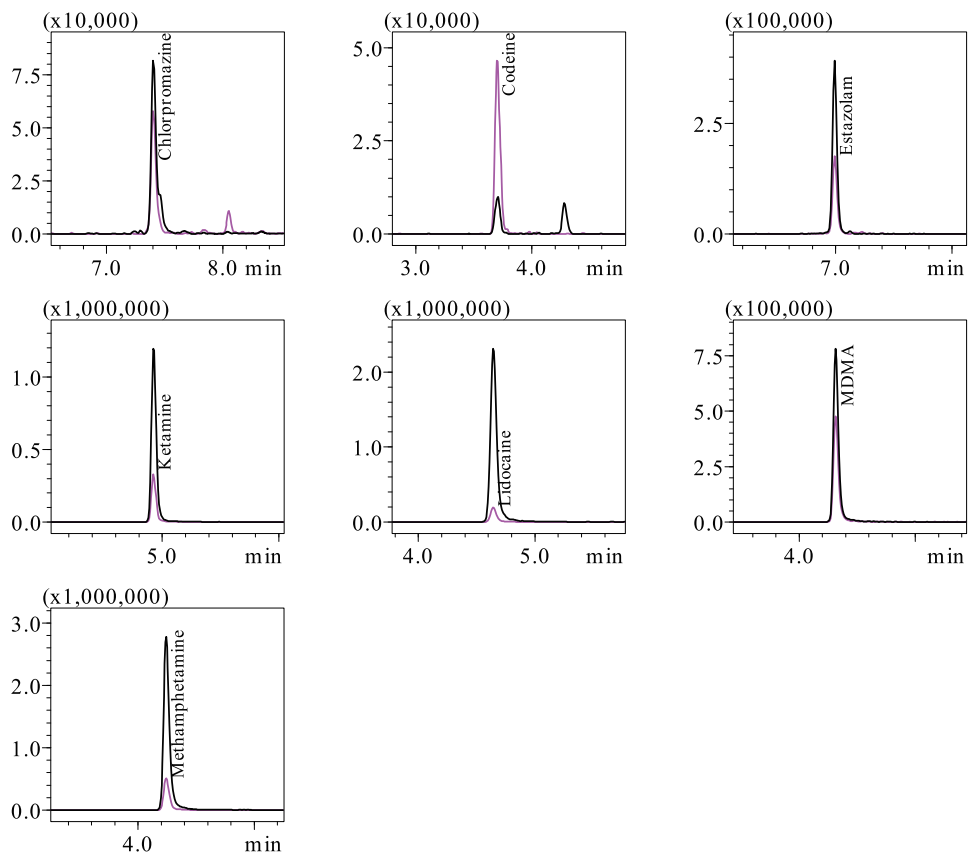


图1 检出化合物MRM色谱图

2.2 谱库搜索结果

方法包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。本应用案例中，采用的“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2所示（图2以Ketamine为例，说明了搜库结果构成）。十种检出物的匹配度结果均在70%及以上，说明得到的筛查结果可靠性良好。

表2 各个检出物搜库匹配度结果

| 编号 | 化合物 | 匹配度 |
|----|------------------|-----|
| 1 | Alprazolam | 85 |
| 2 | Amphetamine | 92 |
| 3 | Chlordiazepoxide | 72 |
| 4 | Chlorpromazine | 78 |
| 5 | Codeine | 70 |
| 6 | Estazolam | 71 |
| 7 | Ketamine | 93 |
| 8 | Lidocaine | 98 |
| 9 | Methamphetamine | 98 |
| 10 | MDMA | 95 |

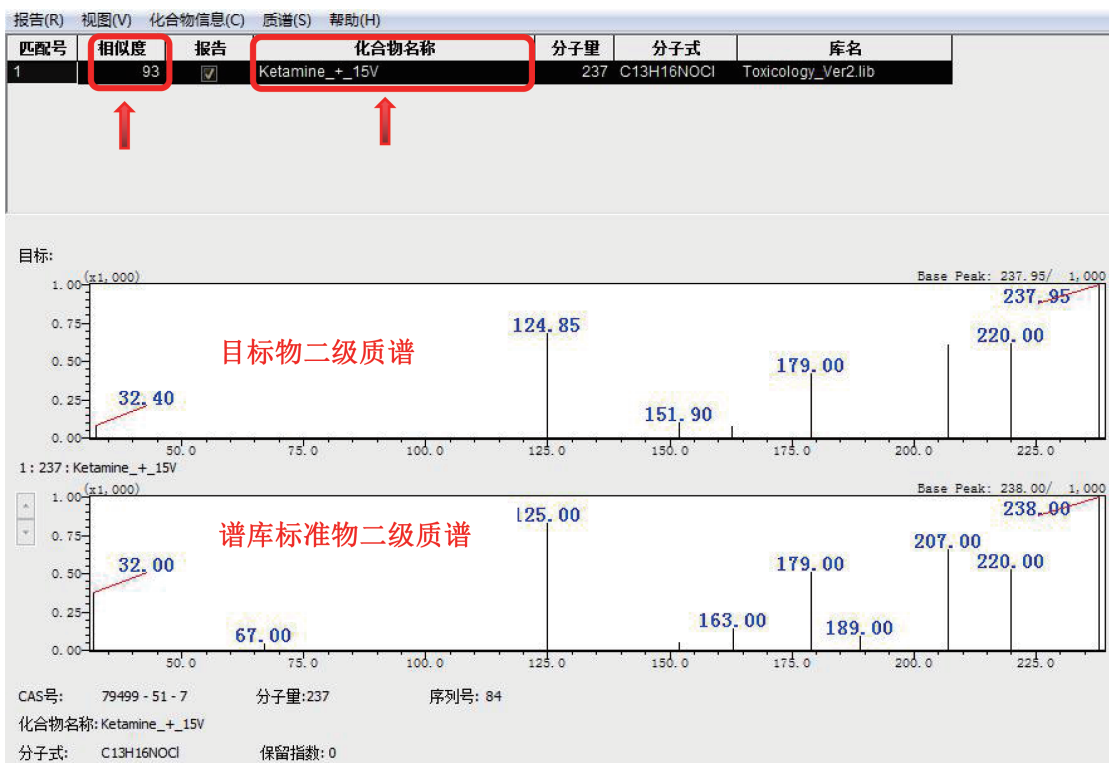


图1 Ketamine二级质谱图(上)与库中二级质谱图(下)匹配情况

2.3 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, 只需准备两种内标物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, 如需获取精确的定量结果, 则需要使用标准品进行的定量操作。表 3 显示了本次筛查分析的半定量结果。

表3 各个检出物半定量分析结果表

| 编号 | 化合物 | 半定量结果 (µg/mL) |
|----|------------------|---------------|
| 1 | Alprazolam | 0.122 |
| 2 | Amphetamine | 0.118 |
| 3 | Chlordiazepoxide | 0.063 |
| 4 | Chlorpromazine | 0.037 |
| 5 | Codeine | 0.098 |
| 6 | Estazolam | 0.276 |
| 7 | Ketamine | 0.321 |
| 8 | Lidocaine | 0.334 |
| 9 | Methamphetamine | 0.313 |
| 10 | MDMA | 0.113 |

■ 结论

本文使用 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)，采用超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8045 联用系统，实现了全血样品中药物毒物的自动化前处理和快速筛查、定性及半定量分析的有机结合。十种加标物质均被筛查出；依据二级质谱库搜索，得到十种检出物的匹配度均在 70% 及以上，表明筛查结果可靠性良好；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了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，减少了有机试剂及生物样品对操作者造成的潜在感染风险及身体伤害，从样品处理到给出定性、半定量结果只需 30 分钟左右时间，大大提高了工作效率，。

附录：方法包中包含化合物清单

本方法包中包含司法刑侦领域中常见的 161 种毒品及药物，通过 LabSolutions LCMS 软件，可在方法包中方法的基础上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。

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|-----------------------|-----|----------------------|
| 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 | Desmethyldiazepam | 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