

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定人血浆中违禁药品浓度

LCMSMS-131

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8080 联用测定人血浆中 15 种违禁药品的方法。该方法在 9 min 内完成吗啡、可待因、杜冷丁、曲多马、冰毒、MDMA、氯胺酮、美沙酮、地西洋、硝西洋、氯硝西洋、阿普唑仑、艾司唑仑、三唑仑、咪达唑仑等常见违禁药品的分析，在血浆中的线性范围均为 0.5~500 ng/mL，相关系数均在 0.997 以上。分别用血浆基质配制 0.5 ng/mL、5.0 ng/mL、50 ng/mL 的标准溶液考察重复性，血浆基质中连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.006% ~ 0.097% 和 0.392% ~ 3.912%，仪器精密度良好。血浆中 15 种违禁药品的定量限在 0.075~0.239 ng/mL 之间，检出限在 0.019~0.060 ng/mL 之间。血浆中加入标准液配制成浓度为 0.5 ng/mL、5 ng/mL、50 ng/mL 的样品每个浓度样品提取 6 次考察样品的回收率，方法回收率在 93.6%~106.2%。基质效应的考察结果表明，各浓度水平基质效应因子在 0.77~1.23。。

关键词：三重四极杆质谱 血浆 违禁药品

违禁精神活性药物导致行为能力下降影响道路交通安全，因服药和吸毒导致车祸的案件逐年增多，已成为一个全球性的公众健康安全问题。根据调查研究表明，服用精神活性药物后对于驾驶操作能力有直接影响。我国道路交通安全法第二十二条规定饮酒、服用国家管制的精神药品或者麻醉品的，不得驾驶机动车。我国卫生部发布的受国家管制的麻醉药品有 118 种，精神药品有 119 种，并明确规定上述品种包括其盐及制剂。我国刑法中第二百五十七条定义的毒品，是指鸦片、海洛因、甲基苯丙胺（冰毒）、吗啡、大麻、可卡因以及国家规定管制的其他能够使人形成瘾癖的麻醉药品和精神药品。

目前人体内毒品检测的方法有免疫测试法、气相色谱法、液相色谱、液质联用法、气质联用法及毛细管电泳法。目前检验检疫部门对出入境人员尿液进行毒品检测的方法 SN/T 2603-2010 主要采用胶体金免疫法快速检测吗啡、甲基安非他明等毒品，但是该方法假阳性较高。近年来，液相色谱-质谱联用技术（LC-MS/MS）的高灵敏度和高选择性，使其在生物分析中得到广泛应用，也成为法医毒物分析的强有力工具。LC-MS/MS 技术能够同时测定多种违禁药品，提高了分析的通量。目前违禁药品检测主要以尿检、血检为主，近年来唾液也成为检违禁药品的有效物质，而且唾液的采集较尿液、血液更为方便，不易逃检。建立简单、快速、准确分析

生物基质中，例如血浆、唾液中违禁药品检测的 LC-MS/MS 方法对于公安交通管理部门快速检测及阳性结果确认毒驾提供，有效防止逃检现象，提高对吸毒驾驶的监管力度。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8080 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-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8080 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.50 SP1 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Inertsil ODS-4 3.0 mm I.D. × 100 mm L.,
2 μm

流动相：A 相 -10 mM 醋酸铵，0.1% 甲酸水溶液；
B 相 - 乙腈

流速：0.6 mL/min

柱温：40°C

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 6%，洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	6
2.50	Pumps	Pump B Conc.	40
6.00	Pumps	Pump B Conc.	90
7.00	Pumps	Pump B Conc.	90
7.01	Pumps	Pump B Conc.	6
9.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8080
 离子源: ESI, 正离子模式分析
 Probe 温度: 400°C
 HSID 温度: 300°C

雾化气流速: 5.0 L/min
 加热气流速: 12.0 L/min
 离子源电压: 4.5 kV
 扫描模式: 多反应监测 (MRM)
 MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

名称	前体离子	产物离子	驻留时间 (ms)	EV (V)	CE(V)	CCL4(V)
吗啡	286.05	153.15*	100	10.0	-58.0	-10.0
		165.15	100	10.0	-56.0	-8.0
可待因	300.10	153.10*	10	40.0	-40.0	-20.0
		199.05	10	20.0	-59.0	-12.5
杜冷丁	248.10	220.10*	10	10.0	-29.0	-10.0
		174.15	10	10.0	-27.0	-15.0
曲多马	264.10	58.40*	10	20.0	-52.0	-3.0
		246.20	10	10.0	-17.0	-15.0
甲基安非他明	150.30	119.20*	10	10.0	-15.0	-10.0
		91.20	10	20.0	-27.0	-5.0
MDMA	194.05	163.10*	10	20.0	-18.0	-15.0
		105.15	10	20.0	-36.0	-6.0
氯胺酮	238.10	125.15*	10	10.0	-24.0	-10.0
		179.10	10	10.0	-39.0	-8.0
美沙酮	310.10	265.05*	10	10.0	-19.0	-15.0
		105.15	10	10.0	-38.0	-8.0
地西洋	284.90	222.00*	10	40.0	-38.0	-20.0
		154.00	10	30.0	-42.0	-12.5
硝西洋	281.95	236.05*	10	30.0	-34.0	-20.0
		207.05	10	20.0	-49.0	-15.0
氯硝西洋	315.90	270.00*	10	40.0	-33.0	-15.0
		241.00	10	30.0	-46.0	-15.0

阿普唑仑	309.00	280.95*	10	20.0	-34.0	-20.0
		274.00	10	40.0	-34.0	-25.0
艾司唑仑	295.00	266.95*	10	20.0	-34.0	-25.0
		240.95	10	20.0	-32.0	-12.5
三唑仑	343.00	314.95*	10	40.0	-36.0	-8.0
		307.95	10	20.0	-38.0	-10.0
咪达唑仑	326.00	291.00*	10	20.0	-38.0	-12.5
		249.00	10	10.0	-48.0	-20.0

注：*表示定量离子

1.3 标准工作溶液的配制

标准物质：共 15 种，分别为吗啡、可待因、杜冷丁、曲马多、甲基安非他明、MDMA、氯胺酮、美沙酮、地西洋、硝西洋、氯硝西洋、阿普唑仑、艾司唑仑、三唑仑和咪达唑仑。

标准工作溶液配制：用乙腈配制 50 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间溶液，用乙腈稀释成 25 $\mu\text{g/mL}$ 、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 不同浓度的混合标准工作液。

1.4 标准曲线的配制

分别用 500 μL 血浆作为空白基质，分别加入 5 μL 不同浓度的标准工作溶液配制成 0.5 ng/mL 、1.0 ng/mL 、2.5 ng/mL 、25 ng/mL 、50 ng/mL 、125 ng/mL 、250 ng/mL 、500 ng/mL 标准曲线。

1.4 样品前处理方法

取 50 μL 的血浆样品，加入 200 μL 的乙腈沉淀，涡旋振荡后 4500 转 / 分钟离心 10 分钟，取上清液直接进样分析。

结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

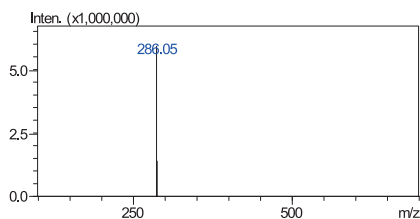


图1 吗啡的一级质谱图

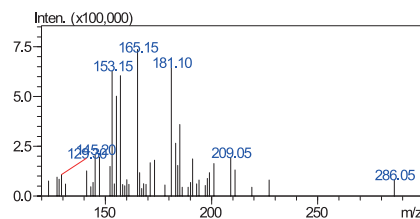


图2 吗啡的产物离子扫描图(CE值-50 V)

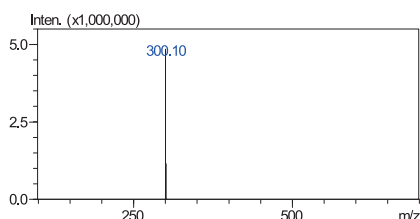


图3 可待因的一级质谱图

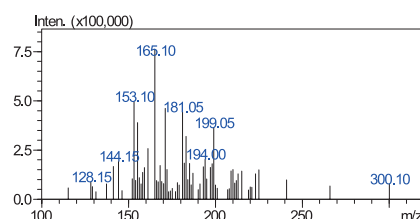


图4 可待因的产物离子扫描图(CE值-50V)

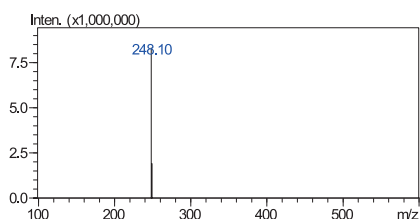


图5 杜冷丁的一级质谱图

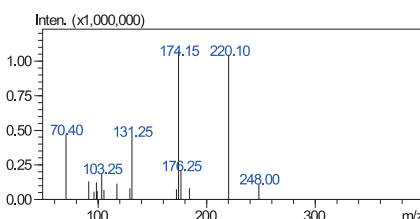


图6 杜冷丁的产物离子扫描图(CE值-40V)

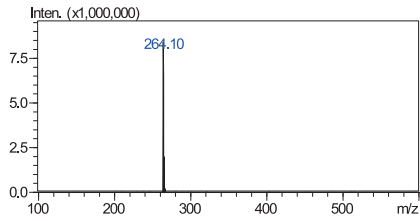


图7 曲马多的一级质谱图

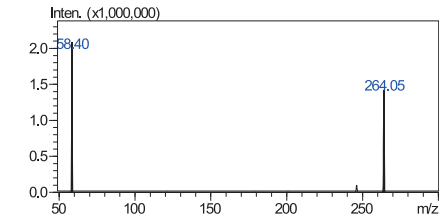


图8 曲马多的产物离子扫描图(CE值-20V)

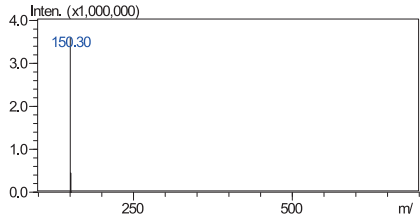


图9 冰毒的一级质谱图

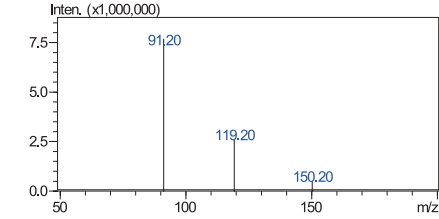


图10 冰毒的产物离子扫描图(CE值-20V)

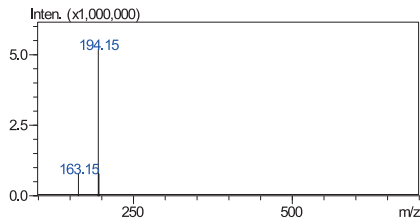


图11 MDMA的一级质谱图

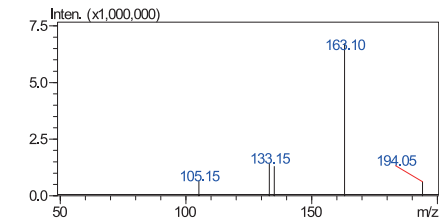


图12 MDMA的产物离子扫描图(CE值-20V)

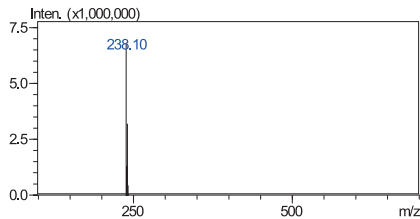


图13 氯胺酮的一级质谱图

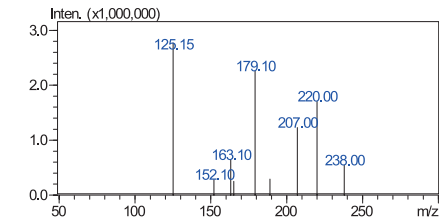


图14 氯胺酮的产物离子扫描图(CE值-25V)

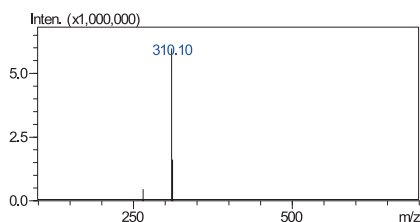


图15 美沙酮的一级质谱图

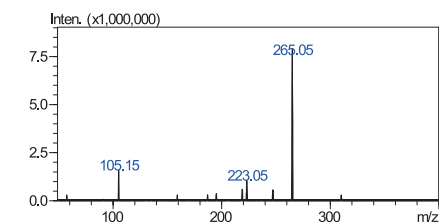


图16 美沙酮的产物离子扫描图(CE值-25V)

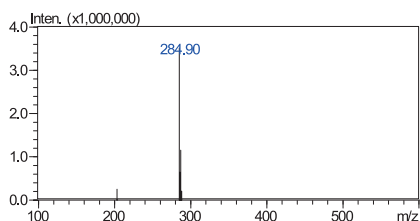


图17 地西洋的一级质谱图

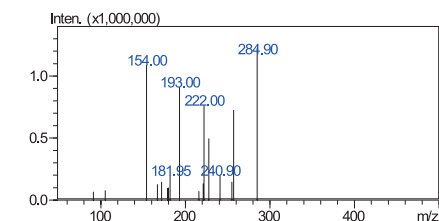


图18 地西洋的产物离子扫描图(CE值-35V)

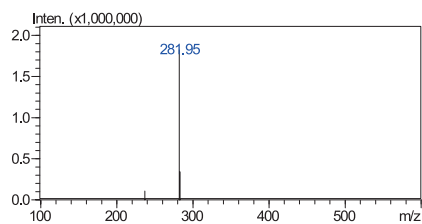


图19 硝西洋的一级质谱图

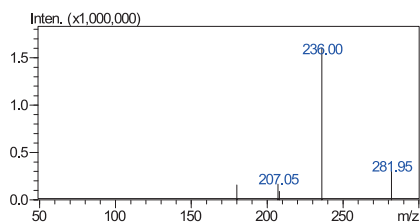


图20 硝西洋的产物离子扫描图(CE值-35V)

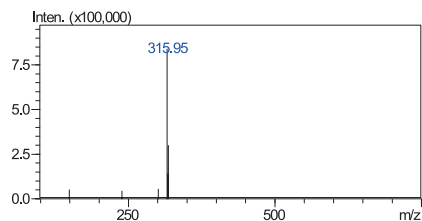


图21 氯硝西洋的一级质谱图

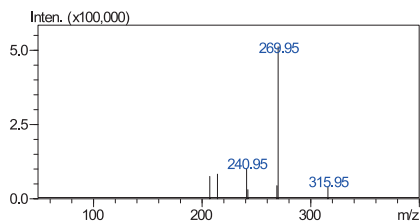


图22 氯硝西洋的产物离子扫描图(CE值-40V)

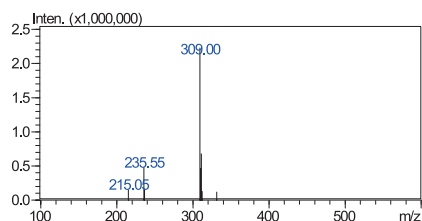


图23 阿普唑仑的一级质谱图

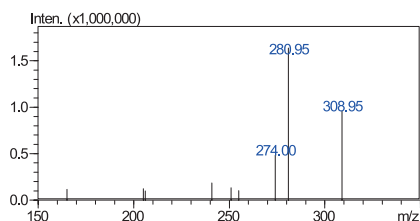


图24 阿普唑仑的产物离子扫描图(CE值-35V)

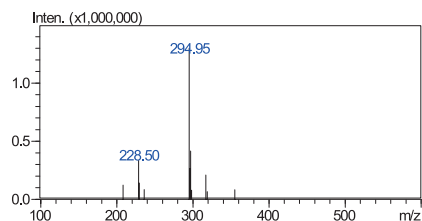


图25 艾司唑仑的一级质谱图

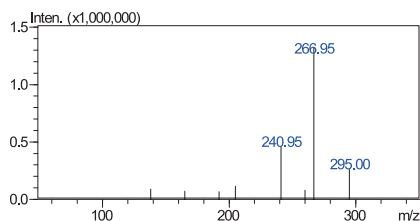


图26 艾司唑仑的产物离子扫描图(CE值-35V)

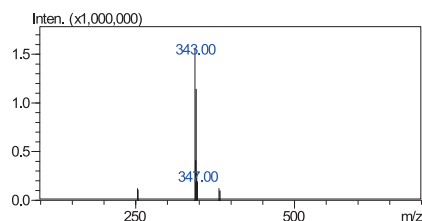


图27 三唑仑的一级质谱图

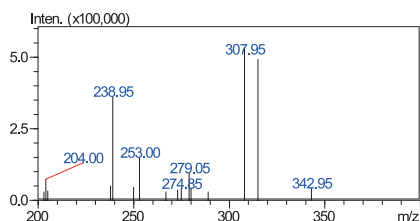


图28 三唑仑的产物离子扫描图(CE值-45V)

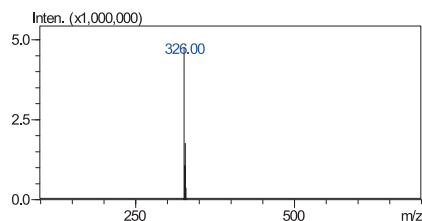


图29 咪达唑仑的一级质谱图

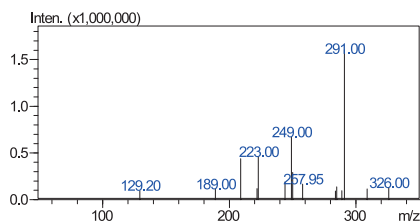


图30 咪达唑仑的产物离子扫描图(CE值-45V)

2.2 血浆加标样品的MRM色谱图

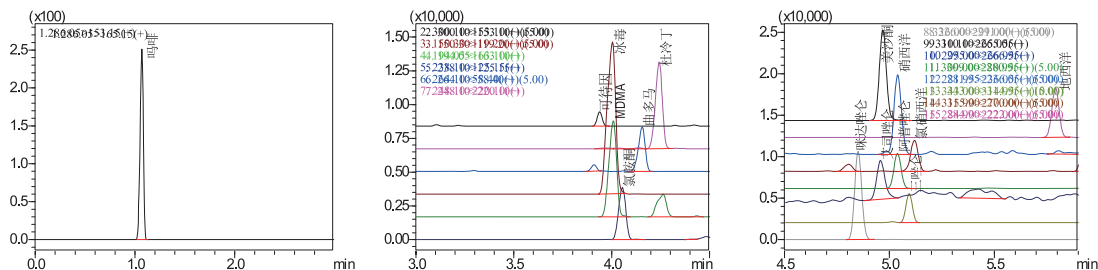


图31 0.5 ng/mL血浆基质加标样品的MRM色谱图

2.3 线性范围

将 0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.5 ng/mL、12.5 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、125 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL 不同浓度的标准溶液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。表 3 为血浆基质的标准曲线相关信息。

表3 血浆基质的校准曲线参数（线性回归，权重为 $1/C^2$ ）

No.	名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
1	吗啡	$Y = (987.854)X + (-100.696)$	0.5~500	95.7~103.1	0.9996
2	可待因	$Y = (556.778)X + (93.2702)$	0.5~500	95.4~105.8	0.9991
3	杜冷丁	$Y = (32440.5)X + (-18.5882)$	0.5~500	91.9~105.2	0.9993
4	曲多马	$Y = (3398.95)X + (-116.767)$	0.5~500	96.1~102.9	0.9996
5	冰毒	$Y = (14028.9)X + (-366.519)$	0.5~500	94.9~104.3	0.9990
6	MDMA	$Y = (39228.2)X + (-273.987)$	0.5~500	92.1~106.5	0.9991
7	氯胺酮	$Y = (20998.1)X + (-348.991)$	0.5~500	94.4~106.0	0.9994
8	美沙酮	$Y = (47810.6)X + (2011.36)$	0.5~500	94.4~105.3	0.9993
9	地西洋	$Y = (7725.84)X + (-974.943)$	0.5~500	93.6~103.9	0.9994
10	硝西洋	$Y = (7895.80)X + (900.410)$	0.5~500	94.5~105.7	0.9992
11	氯硝西洋	$Y = (3345.56)X + (213.103)$	0.5~500	96.5~103.9	0.9995
12	阿普唑仑	$Y = (21522.8)X + (-587.656)$	0.5~500	93.5~106.8	0.9992
13	艾司唑仑	$Y = (24186.2)X + (1042.73)$	0.5~500	93.2~104.6	0.9993
14	三唑仑	$Y = (1810.25)X + (-124.519)$	0.5~500	94.2~105.6	0.9992
15	咪达唑仑	$Y = (10359.3)X + (-99.8911)$	0.5~500	93.8~108.9	0.9991

2.4 重复性实验

对不同浓度混合标准溶液连续测定 6 次，考察仪器的重复性，保留时间和峰面积的重复性结果如表所示，表 4 为血浆基质中所测得重复性数据。结果显示：血浆基质中不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.006% ~ 0.097% 和 0.392% ~ 3.912% 之间，仪器精密度良好。

表4 血浆基质中保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (5.0 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
吗啡	0.080	2.296	0.079	1.527	0.096	0.540
可待因	0.089	3.813	0.031	1.954	0.015	0.589
杜冷丁	0.009	1.786	0.026	1.372	0.007	0.496
曲多马	0.097	3.055	0.081	2.153	0.038	0.902
冰毒	0.037	1.437	0.035	1.084	0.016	0.941
MDMA	0.040	1.756	0.037	1.363	0.013	0.985
氯胺酮	0.022	1.648	0.030	1.001	0.006	0.588
美沙酮	0.012	1.032	0.023	1.185	0.009	0.656
地西洋	0.029	1.299	0.017	1.281	0.008	0.448
硝西洋	0.039	1.932	0.018	1.337	0.008	0.392
氯硝西洋	0.023	3.058	0.019	1.889	0.008	0.916
阿普唑仑	0.010	2.008	0.020	1.085	0.008	0.886
艾司唑仑	0.016	3.448	0.024	1.527	0.007	0.968
三唑仑	0.050	3.912	0.025	2.432	0.009	1.057
咪达唑仑	0.035	1.908	0.024	1.654	0.006	1.251

2.5 灵敏度实验

为了考察方法的灵敏度,用血浆基质分别配制浓度为 0.5 ng/mL 标准溶液,平行进样 7 次分析结果。由 7 次进样测定的标准偏差 (S) 计算出检测限和最低定量浓度,此时检出限 $MDL = 3.14 \times S$, 定量下限 $LOQ=4 \times MDL$ 。测定结果如表 5 所示。

表5 灵敏度实验结果 (n=7)

No.	名称	血浆基质		
		标准偏差 (S)	定量限 (ng/mL)	检出限 (ng/mL)
1	吗啡	0.011	0.138	0.035
2	可待因	0.017	0.214	0.053
3	杜冷丁	0.008	0.100	0.025
4	曲多马	0.015	0.188	0.047
5	冰毒	0.007	0.088	0.022
6	MDMA	0.008	0.100	0.025
7	氯胺酮	0.008	0.100	0.025
8	美沙酮	0.006	0.075	0.019
9	地西洋	0.012	0.151	0.038
10	硝西洋	0.011	0.138	0.035
11	氯硝西洋	0.015	0.188	0.047
12	阿普唑仑	0.010	0.126	0.031

13	艾司唑仑	0.018	0.226	0.057
14	三唑仑	0.019	0.239	0.060
15	咪达唑仑	0.012	0.151	0.038

2.6 回收率考察

血浆中加入标准液配制成浓度为 0.5 ng/mL、5 ng/mL、50 ng/mL 的样品每个浓度样品提取 6 次考察样品的回收率，结果如表 6 所示，方法回收率在 93.6%~106.2%。

表6 回收率结果 (n=6)

化合物	平均回收率 (%)			回收率精密度 (RSD%)		
	0.5 ng/mL	5 ng/mL	50 ng/mL	0.5 ng/mL	5 ng/mL	50 ng/mL
吗啡	100.3	100.6	97.4	2.27	3.95	0.83
可待因	93.6	95.1	100.2	3.67	4.22	4.48
杜冷丁	100.8	100.4	99.0	1.79	1.48	0.60
曲多马	98.3	106.2	101.7	3.11	2.20	5.70
甲基安非他明	99.8	100.9	99.7	1.44	2.12	0.85
MDMA	99.2	100.7	99.7	1.76	2.86	0.83
氯胺酮	100.2	100.8	100.3	1.65	2.89	0.56
美沙酮	100.1	100.0	100.2	1.03	1.52	0.35
地西洋	100.4	98.8	100.2	1.30	2.86	1.11
硝西洋	100.0	100.8	100.1	1.92	3.72	2.44
氯硝西洋	101.4	101.4	99.7	3.05	2.30	1.34
阿普唑仑	99.5	98.8	100.1	2.01	2.85	1.49
艾司唑仑	101.2	99.9	99.7	3.45	1.76	0.71
三唑仑	98.9	100.7	98.7	3.90	4.71	5.61
咪达唑仑	100.2	99.3	101.2	1.91	1.74	2.06

2.6 基质效应考察

比较空白血浆处理后中加入标准液配制成浓度为 0.5 ng/mL、5 ng/mL、50 ng/mL 的样品和相同进样浓度标准溶液的峰面积变化，计算 15 种物质的基质效应因子，结果见表 7，各浓度水平基质效应因子在 0.77~1.23。

表7 基质效应考察结果

化合物	基质效应因子		
	0.5 ng/mL	5 ng/mL	50 ng/mL
吗啡	1.23	1.01	1.10
可待因	1.05	1.11	0.99
杜冷丁	1.06	1.02	1.05
曲多马	0.94	0.95	0.97
甲基安非他明	0.91	1.13	1.06
MDMA	0.97	1.01	1.03
氯胺酮	1.05	0.99	0.97
美沙酮	1.00	1.10	1.09
地西洋	0.98	1.05	1.05
硝西洋	0.77	0.91	1.01
氯硝西洋	0.83	0.96	1.03
阿普唑仑	1.11	1.04	1.06
艾司唑仑	1.01	0.98	1.02
三唑仑	0.92	1.01	1.03
咪达唑仑	0.84	0.98	1.01

结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8080 联用测定血浆中 15 种违禁药品的方法。该方法在 9 min 内完成吗啡、可待因、杜冷丁、曲多马、冰毒、MDMA、氯胺酮、美沙酮、地西洋、硝西洋、氯硝西洋、阿普唑仑、艾司唑仑、三唑仑、咪达唑仑的分离，线性范围为 0.5~500 ng/mL，标准曲线各点准确度为 91.9~108.9%，相关系数均在 0.997 以上。血浆基质中不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.006% ~ 0.097% 和 0.392% ~ 3.912% 之间，仪器精密度良好。血浆中 15 种违禁药品的定量限在 0.075~0.239 ng/mL 之间，检出限在 0.019~0.060 ng/mL 之间。血浆中加入标准液配制浓度为 0.5 ng/mL、5 ng/mL、50 ng/mL 的样品每个浓度样品提取 6 次考察样品的回收率，方法回收率在 93.6%~106.2%。基质效应的考察结果表明，各浓度水平基质效应因子在 0.77~1.23。方法验证结果表明，本方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，适合血浆中违禁药品含量的快速检测。