

基于质谱成像技术原位可视化干血斑中违禁药物的空间分布

IMSCope-020

摘要：干血斑技术是检测血液样品中违禁药物的重要检测手段。违禁药物在干血片中的分布是否会出现富集或不均匀的情况，尚缺少直观可视化的研究依据。本研究应用成像质谱显微镜 iMScope QT 分析了干血斑中 5 种违禁药物的空间分布，发现药物在收集纸上分布不均匀，呈现中心富集趋势，边缘含量相对较少，为血斑中违禁药物检测的取材位置提供参考。

关键词：成像质谱显微镜 iMScope QT 干血斑 违禁药物 空间分布

技术特点：

- ❖ 首次通过原位可视化的方式揭示干血斑中违禁药物的空间分布特征。
- ❖ 前处理简单，无需制作切片或特殊处理，可将干血斑直接粘贴在载玻片上进行分析。

干血斑 (Dried Blood Spot) 是一种新型样本采集技术，也被称为干血点或干血片。干血斑技术能够方便地对血液样品中的违禁药物进行快速分析，在酒后驾驶检查、滥用药物检测、兴奋剂检测等毒物分析场景具有显著优势。干血斑的制作方法为用移液器从样品管中吸取一定体积的抗凝血液样品，滴加在滤纸印圈的中心处，或将穿刺后自皮肤伤口流出的末梢全血直接滴加在滤纸印圈的中心处，室温干燥 3-4 小时。用于制作干血斑的滤纸片 (样本收集纸或血液采集卡，如国际上常用的 Whatman903) 具有一定纤维结构，在血斑制作过程中是否会对违禁药物产生局部富集作

用，违禁药物在滤纸片上的分布是否均匀，学术界通过密集打孔的方式进行了初步研究，但打孔方式受孔径影响，无法做到足够精准，也无法做到直观的可视化。本研究应用成像质谱显微镜 iMScope QT 分析了干血斑中 5 种违禁药物的空间分布，发现药物在收集纸上分布不均匀，呈现中心富集趋势，边缘含量相对较少，为血斑中违禁药物检测的取材位置提供了参考，同时针对干血斑中药毒物分析，初步建立了区别于传统 LC-MS/MS 法的新分析方法，为检验手段和实际的应用拓展了思路。

■ 实验部分

1.1 仪器

成像质谱显微镜 iMScope QT。

1.2 仪器参数

分析模式：	正离子	激光器：	355 nm YAG 激光器
像素间距：	50*50 μm	激光照射直径：	40 μm
激光能量：	69 (范围 0-100)	激光照射次数：	200 shots
扫描频率：	2000 Hz	扫描范围：	m/z 100-400
检测器电压：	2.20 kV		

1.3 试剂与样品

基质：CHCA (α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸)。

违禁药物标准品：来自研究单位的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的违禁药物标准品溶液。

表 1 违禁药物化合物信息

样品编号	中文名	英文名称	分子式	精确分子质量 (Da)
1	芬太尼	Fentanyl	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	336.2202
2	甲基苯丙胺	Methamphetamine	C ₁₀ H ₁₅ N	149.12045
3	利多卡因	Lidocaine	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	234.1732
4	氯胺酮	Ketamine	C ₁₃ H ₁₆ ClNO	237.09204
5	地西洋	Diazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284.0716

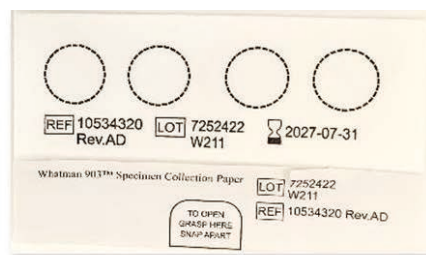
1.4 样品前处理

不锈钢靶板 + 违禁药物：将 5 种标准品混合，加入甲醇依次稀释为 1 μg/mL 至 10 ng/mL，取 1 μL 标准品混合溶液滴加在普通不锈钢靶板上并添加 1 μL CHCA 基质溶液，自然干燥。

干血斑制作：将违禁药物混合标准品及芬太尼单标使用血液稀释至 1 μg/mL，取 20 μL 含违禁药物的血液滴加在样品收集纸中心，自由扩散，室温干燥 3 小时。

干水斑制作：将违禁药物混合标准品及芬太尼单标加水稀释至 1 μg/mL、100 ng/mL，取 20 μL 含违禁药物的水溶液滴加在样品收集纸中心，自由扩散，室温干燥 3 小时。

基质涂敷：将样品收集纸裁剪适合大小通过导电双面胶粘贴在载玻片上。使用基质升华仪 iMLayer 在样品表面涂敷 CHCA 基质，加热温度设定为 250℃，基质厚度设定为 0.7 μm。



用于制作干血斑的 Whatman903 样本收集纸



干血斑：样本收集纸 + 20 μL 血液 + 违禁药物



干水斑：样本收集纸 + 20 μL 水 + 违禁药物

图 1 用于制作干血斑的 Whatman 903 样本收集纸及干血斑、干水斑等样品

■ 结果与讨论

2.1 违禁药物标准品分析

将 5 种违禁药物标准品稀释至不同浓度 (1 μg/mL 至 10 ng/mL)，以 CHCA 为基质，使用不锈钢靶板应用成像质谱显微镜进行分析，不同浓度的 5 种药物均能有效离子化，其中芬太尼离子化效率最高，药品灵敏度较好。

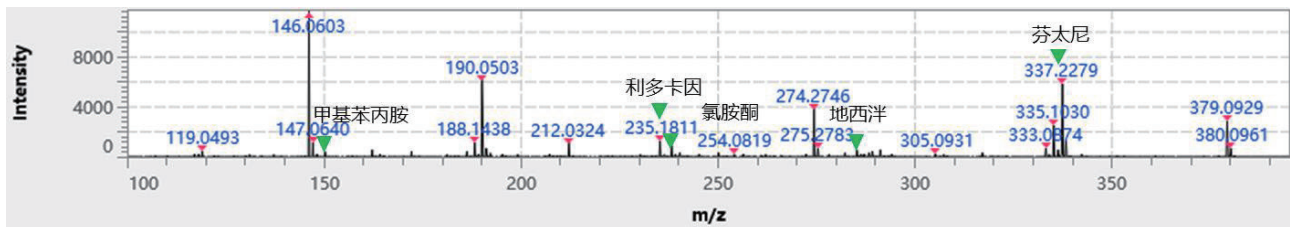


图2 违禁物质质谱图示例 (浓度: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

2.2 收集纸对违禁药物的富集作用考察

为考察样品收集纸本身对违禁药物的富集作用，排除以血液为基质时血液对违禁药物分布的影响，测试以水为基质时收集纸中芬太尼的空间分布。将芬太尼单标及违禁药物混合标准品加水稀释后点在样本收集纸中，应用成像质谱显微镜进行质谱采集，质谱数据导入 IMAGEREVEAL MS 软件进行分析，ROI 设定及芬太尼的空间分布图见图 3。以水为基质，1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芬太尼在样本收集纸上的信号强度相比不锈钢靶板显著降低，检测到 100 ng/mL 芬太尼在收集纸上的空间分布。这可能是由于收集纸不导电，化合物离子化效率较低，并且多数药物与水一起被吸收进入收集纸纤维内部，表面被检测到的药物量比较有限。

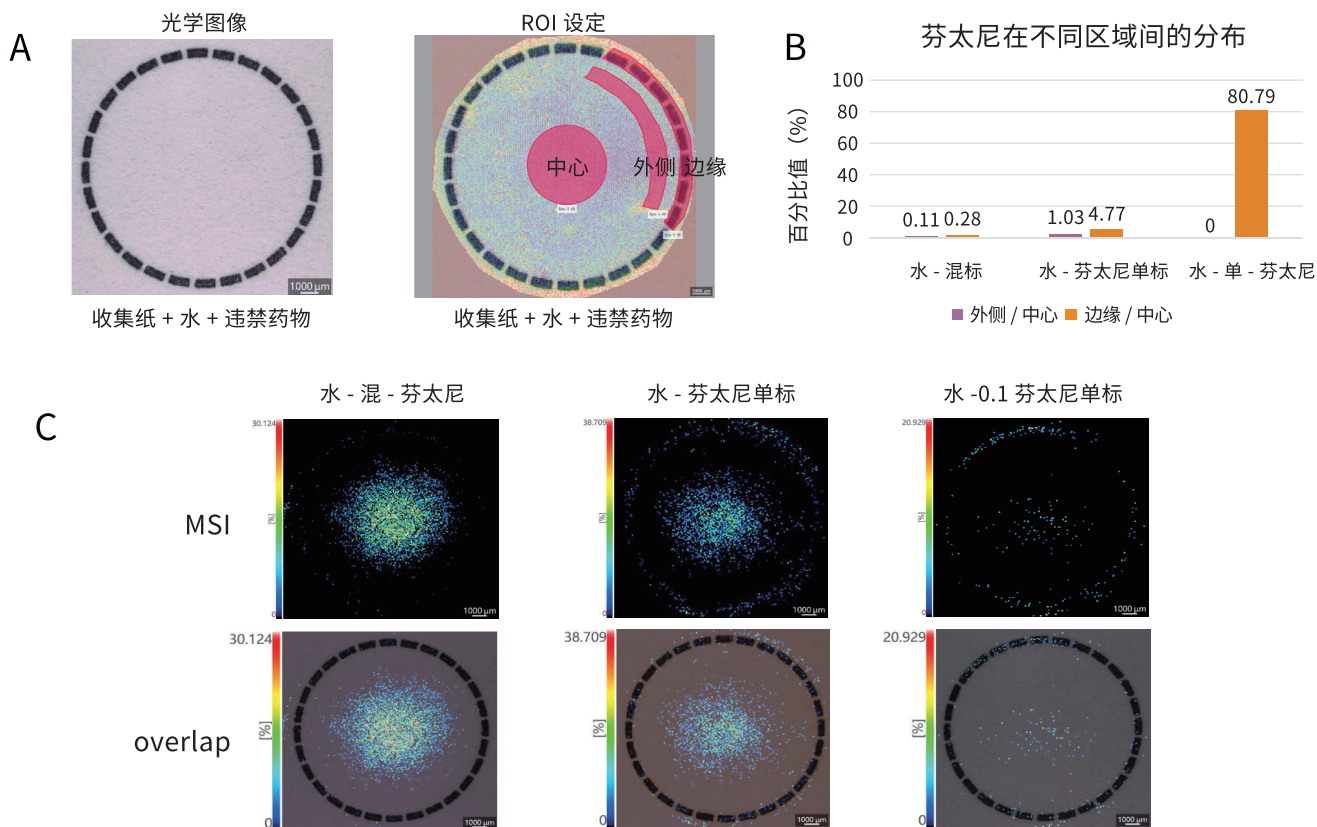


图3 干水斑中芬太尼的空间分布。A. 收集纸光学图像与 ROI 设定；B. 芬太尼在不同区域间的分布；C. 芬太尼在收集纸中的空间分布图

表 2 干水斑中芬太尼 IMAGEREVEAL MS 软件分析结果

样品编号	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	标准品 类别	中心 (信号强度)	外侧 (信号强度)	边缘 (信号强度)	外侧 / 中心 (%)	边缘 / 中心 (%)
收集纸 - 水 - 混标	1	混标	294.50	0.32	0.83	0.11	0.28
收集纸 - 水 - 芬太尼单标	1	单标	124.38	1.28	5.93	1.03	4.77
收集纸 - 水 - 0.1 芬太尼单标	0.1	单标	1.54	0.00	1.25	0.00	80.79

以水为基质时，芬太尼在收集纸上呈现中心富集趋势，向外含量逐渐降低，在边缘部分含量略高。混标中芬太尼的中心富集趋势非常显著，边缘分布相对较少。推测部分原因可能与其他违禁药物的存在可一定程度上提高芬太尼的离子化效率有关。单标样品中芬太尼的边缘富集趋势相比混标更显著。浓度为 100 ng/mL 芬太尼单标的边缘区域中芬太尼信号强度相比中心区域的比值，与另外两份芬太尼浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的样品相比更高，但其分布与收集纸上的黑色墨印有较多重合，可能部分原因与黑色墨印中的离子一定程度上提高了电导性，进而提高了芬太尼的离子化效率有关。

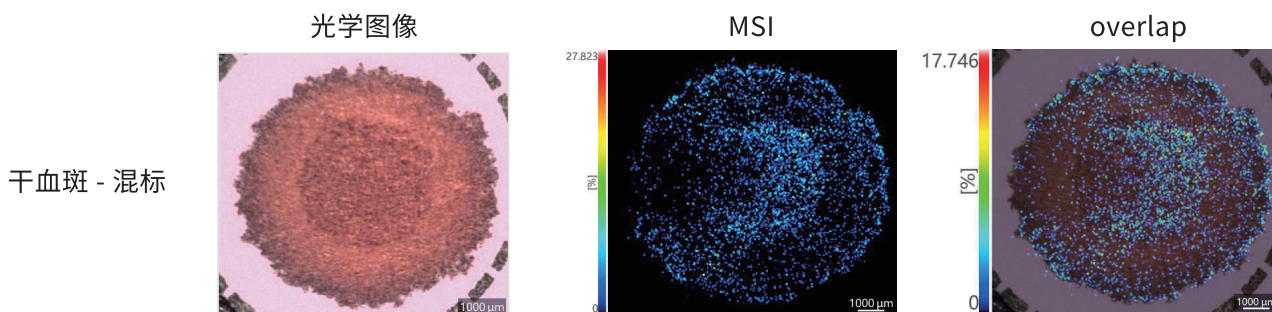
2.3 干血斑中违禁药物的空间分布

对干血斑中芬太尼的空间分布进行质谱成像分析，结果见图 4，IMAGEREVEAL MS 软件分析结果见表 3。结果显示，芬太尼在样品收集纸上呈现中心富集趋势，向外含量逐渐降低，在边缘部分含量略高。与以水为基质时相比，血斑中芬太尼在收集纸上的分布相对更加均匀，外侧与边缘区域含量更高。干血斑 - 芬太尼单标的芬太尼含量边缘区域与中心区域的比值，为干血斑 - 混标的 2 倍，表明单标中芬太尼的边缘富集趋势更明显，这与以水为基质的情况趋势一致。

水斑基质和血斑基质的扩散趋势的差别，可能与不同流体在纸基质上的扩散速度相关。血斑基质受其粘稠度影响，向外周和向纸面下扩散速度更慢，分布相对更加均匀。另外，血斑中化学成分丰富，部分吸附在滤纸片纤维表面，可能一定程度减少了纤维对违禁药物的吸附作用。

表 3 干血斑中违禁药物 IMAGEREVEAL MS 软件分析结果

样品编号	标准品类别	Label	m/z	中心 (信号强度)	外侧 (信号强度)	边缘 (信号强度)	外侧 / 中心 (%)	边缘 / 中心 (%)
干血斑 - 混标	混标	芬太尼	337.2275	131.55	59.15	108.80	44.97	82.71
干血斑 - 芬太尼单标	单标	芬太尼	337.2275	64.74	29.66	107.30	45.82	165.76
干血斑 - 混标	混标	甲基苯丙胺	150.1278	156.43	40.64	17.67	25.98	11.29
干血斑 - 混标	混标	利多卡因	235.1805	123.33	60.22	92.38	48.83	74.90
干血斑 - 混标	混标	氯胺酮	238.0993	71.54	56.40	55.20	78.83	77.16
干血斑 - 混标	混标	地西泮	285.0789	8.11	5.59	5.82	68.97	71.84



干血斑 - 芬太尼单标

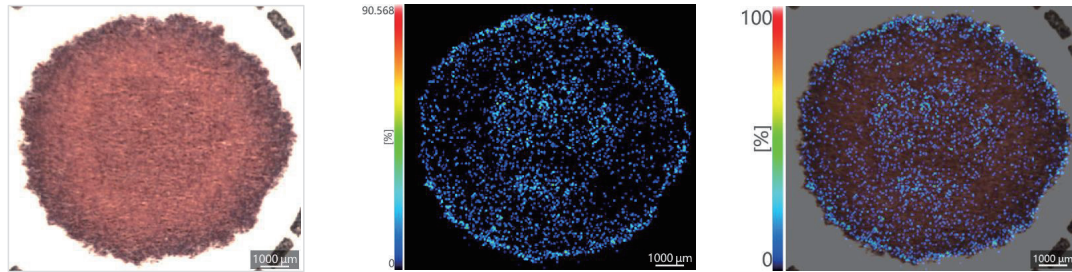


图4 干血斑中芬太尼的空间分布

甲基苯丙胺、利多卡因、氯胺酮、地西洋的空间分布图见图5，4种药物在收集纸中均呈现中心富集趋势，药物在外侧与边缘区域均有分布，分布相对均匀，利多卡因边缘呈现富集趋势，其他三种药物没有这种趋势。

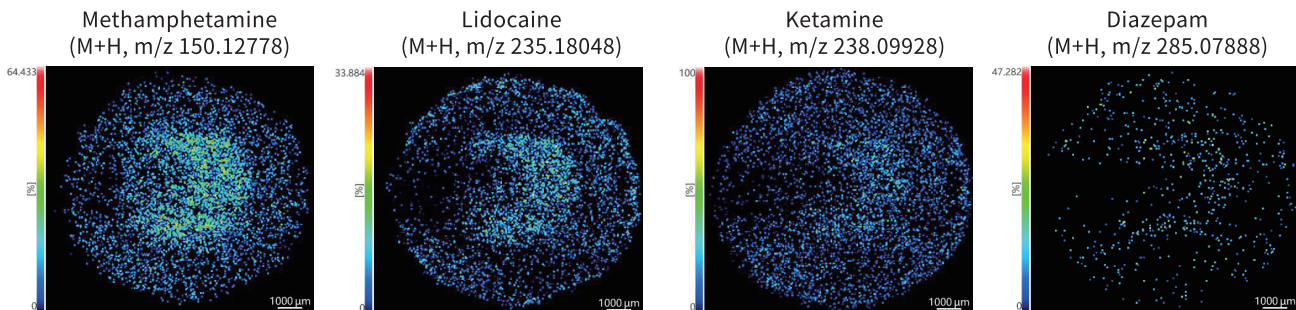


图5 干血斑中甲基苯丙胺、利多卡因、氯胺酮、地西洋的空间分布

■ 结论

本文应用岛津成像质谱显微镜 iMScope QT 分析了干血斑中 5 种违禁药物的空间分布，发现药物在干血斑中分布不均匀，均呈现中心富集趋势，向外含量逐渐降低。为排除以血液为基质时血液对违禁药物分布的影响，同时考察了以水为介质时芬太尼在样本收集纸中的空间分布，结果显示药物的分布同样在中心区域含量较高，且中心富集趋势相比干血斑更显著。该结果通过原位可视化的方式为干血斑中违禁药物的空间分布和准确定量提供了参考。

岛津应用云

