

全自动在线前处理仪与 LC-MS/MS 联用系统测定尿液中毒品替代物依托咪酯及其代谢物

LCMSMS-863

摘要： 本文建立了一种使用岛津全自动在线前处理仪 CLAM-2030 和超高效液相色谱三重四极杆质谱仪联用系统测定尿液中毒品替代物依托咪酯及其代谢物的分析方法。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 LC-MS/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。本方法采用内标法定量，化合物线性、重复性良好，不同浓度水平加标实验考察回收率，各组分的回收率在 95.5~115.5% 之间，方法可靠性良好，适合尿液中依托咪酯及其代谢物的快速定量检测。

关键词： 在线全自动前处理 CLAM-2030 尿液 依托咪酯

技术特点：

- ❖ 使用全自动前处理仪，实现自动化前处理，减小人为误差，提高分析准确度。
- ❖ 实现尿液中依托咪酯及代谢物同时检测，为依托咪酯滥用监管提供参考。

依托咪酯为非巴比妥类静脉麻醉药（分子式 $C_{14}H_{16}N_2O_2$ ），是麻醉诱导常用的药物之一，在临床应用已有 30 年的历史。一般为静脉用药，作用迅速但短暂，入睡快，苏醒也快，对中枢神经系统有较强的抑制作用。前期由于暂不属于管制类精神药品，一些不法分子将其当做毒品替代品进行销售，造成部分地区出现依托咪酯滥用问题。

依托咪酯静脉注射后很快进入脑和其他血流丰富的器官，主要在肝内进行代谢和转化，代谢的主要产物为依托咪酯 (ET) 的水解物 R-(+)-1-(1-苯乙基)-1H 咪唑-5 羧酸 (ETA)。2023 年 9 月 11 日，国家药监局网站发布公告，将依托咪酯（在中国境内批准上市的含依托咪酯的药品制剂除外）列入第二类精神药品目录，自 2023 年 10 月 1 日起施行。

蛋白沉淀法是毒物分析过程中对生物样品进行前处理的一种常用方式。对于富含蛋白质的检材，在进行分离、提取时要将大量干扰测定的蛋白质沉淀除去，使待测毒物仍留存于溶液中。但是离线蛋白沉淀法操作人员频繁接触甲醇、乙腈、高氯酸等沉淀剂和生物样品，具有潜在的生物危害风险。

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。本文利用该系统建立了尿液中依托咪酯及其代谢物的测定方法，该方法简单、快速、准确，可为依托咪酯滥用管控提供有效依据，可供公安司法领域检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津全自动在线前处理仪 CLAM-2030 和超高效液相色谱三重四极杆质谱 LCMS-8050 联用仪，配置如下：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A_{SR}

输液泵：LC-30ADx2

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 GIST-HP C18-AQ (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:227-30807-02)

流 动 相 : A-0.1% 甲酸 - 水溶液; B-0.1% 甲酸 - 甲醇溶液

进 样 体 积 : 5 μ L 柱 温 : 40°C

流 速 : 0.25 mL/min

清 洗 模 式 : Rinse Pump->Rinse Port

(R3 清洗液为甲醇 / 乙腈 / 异丙醇 / 水 =1/1/1/1)

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 60%, 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
1.50	泵	B Conc	85
5.00	泵	B Conc	100
7.00	泵	B Conc	100
7.10	泵	B Conc	60
10.00	控制器	STOP	

质谱条件

离子化模式 : ESI(+)

接 口 温 度 : 300°C

雾化气流速 : 3.0 L/min

D L 温 度 : 200°C

加热气流速 : 10.0 L/min

加热模块温度 : 400°C

干燥气流速 : 10.0 L/min

接 口 电 压 : 1 kV

扫描模式 : 多反应监测 (MRM)

MRM 参 数 : 见表 2

表 2. MRM 参数

序号	中文名称	英文缩写	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 pre (V)	CE(V)	Q3 Pre (V)
1	依托咪酯	ET	33125-97-2	245.20	105.15* 141.20	-17.0 -19.0	-24.0 -11.0	-17.0 -24.0

2	R-(+)-1-(1-苯乙基)-1H咪唑-5羧酸	ETA	3157-27-5	217.20	113.10*	-15.0	-11.0	-19.0
					95.15	-15.0	-25.0	-14.0
3	美托咪脂 (内标)	MET	5377-20-8	231.20	95.10*	-10.0	-26.0	-15.0
					127.15	-26.0	-11.0	-22.0

注：* 表示定量离子对

1.3 基质校准曲线溶液配制

分别取 ET 和 ETA 对照品储备液 (100 µg/mL)，用甲醇逐级稀释，分别得到 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 和 10 µg/mL 的混合标准工作溶液。分别取各浓度的混合标准工作溶液 100 µL 和 10 µL MET 内标 (浓度为 2 µg/mL)，加入 890 µL 空白尿液得到浓度分别为 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 和 1000 ng/mL，内标浓度为 20 ng/mL 的基质校准曲线溶液。

1.4 样品前处理

在 CLAM-2030 工作站界面优化自动前处理参数，样品在线稀释、蛋白沉淀剂使用量、震摇转速、震摇时间、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 µL 甲醇活化过滤管，准备上样；
- (2) 吸取基质校准曲线溶液或尿液样品 30 µL 上样，用水稀释一倍；
- (3) 吸取蛋白沉淀剂甲醇 60 µL；
- (4) 转速 3000 rpm 震摇 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 5 µL (前处理流程示意图见图 2)。

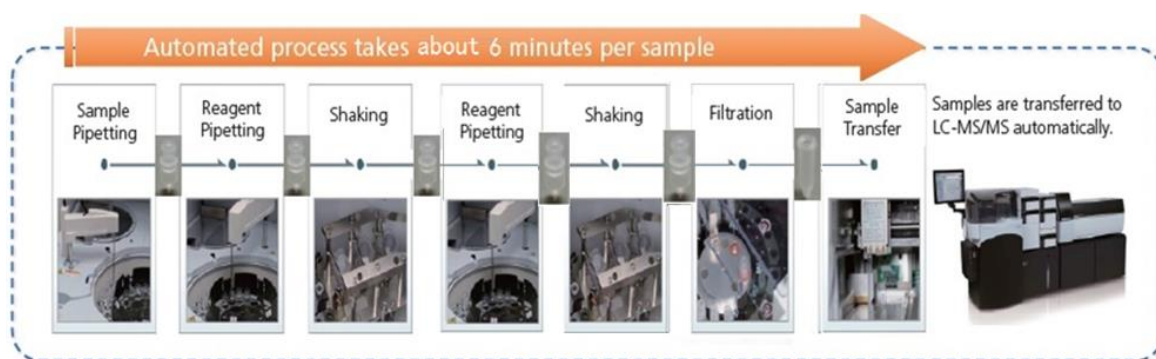


图 2. CLAM-2030 在线自动前处理流程示意图

■ 结果与讨论

2.1 专属性

按 1.2 中的分析条件进行测定，空白样品和 2 ng/mL 的基质校准曲线溶液的 MRM 色谱图如下图 3 所示，各化合物色谱峰形良好，通道无干扰。

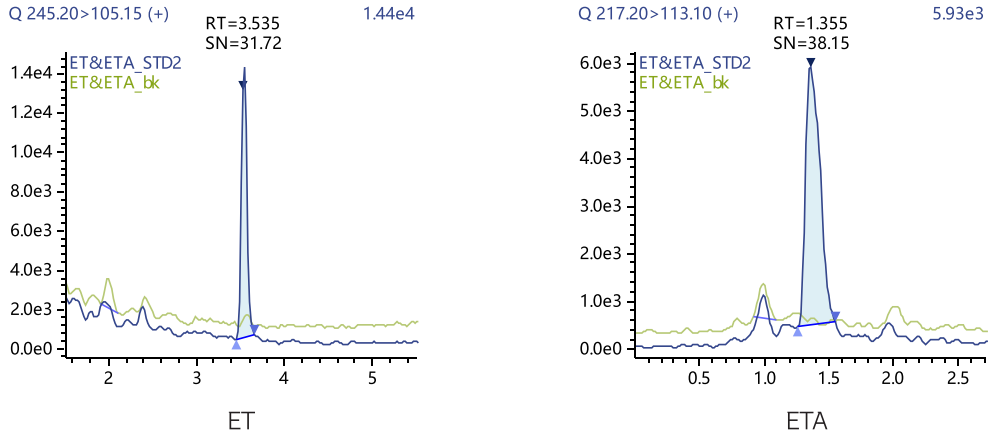


图 3. 空白样品和 2 ng/mL 的基质校准曲线溶液的 MRM 色谱图

2.2 线性范围

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度比为横坐标，峰面积比值为纵坐标，以内标法绘制校准曲线，所得校准曲线线性范围为 2~1000 ng/mL，线性关系良好，相关系数均大于 0.999，准确度在 93.7%~107.2% 之间，线性方程等参数见图 4。

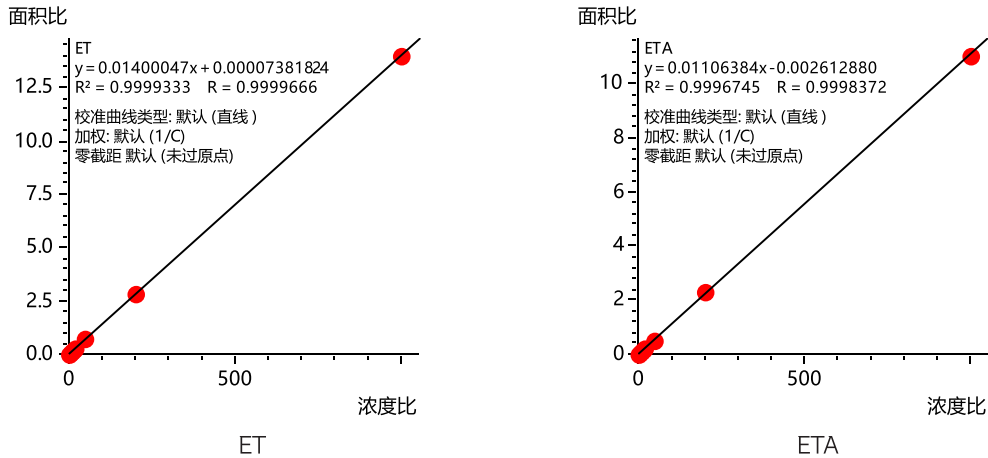


图 4. ET 和 ETA 校准曲线

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 3 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 0.04%~0.35% 和 0.27%~1.53% 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=3)

序号	名称	低浓度 (5 ng/mL)		中浓度 (100 ng/mL)		高浓度 (1000 ng/mL)	
		保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
1	ET	0.08	1.29	0.04	1.28	0.16	0.39
2	ETA	0.07	0.27	0.06	0.57	0.35	1.53

2.4 加标回收率

向空白尿液中添加 ET 和 ETA 对照品溶液，加标浓度为 5、100 和 1000 ng/mL，每个水平重复测定 3 次，质控样品的准确度和精密度结果如表 4 所示，平均回收率在 95.5~115.5% 之间，RSD% 在 0.27 ~1.75% 之间。

表 4. 方法回收率结果 (n=3)

序号	名称	加标浓度 (5 ng/mL)		加标浓度 (100 ng/mL)		加标浓度 (1000 ng/mL)	
		回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD%)	回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD%)	回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD%)
1	ET	100.5	0.56	115.5	1.75	95.5	1.19
2	ETA	101.5	0.80	112.7	0.27	97.1	1.18

■ 结论

本文建立了一种使用岛津全自动在线前处理仪 CLAM-2030 和超高效液相色谱三重四极杆质谱仪联用系统测定尿液中毒品替代物依托咪酯及其代谢物的分析方法。方法验证结果表明：在考察的线性范围内，线性相关系数均大于 0.999，线性良好，低中高对照品溶液重复进 3 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差 RSD% 分别在 0.04%~0.35% 和 0.27%~1.53% 之间，仪器重复性良好，加标回收率在 95.5~115.5% 之间。该方法实现从前处理到目标物检测，全部由仪器自动完成，操作简单，结果准确可靠，可为依托咪酯滥用检测提供参考。

岛津应用云

