

Liquid Chromatography/
Mass Spectrometry

作者

Sharanya Reddy

Blas Cerda

PerkinElmer, Inc.
Shelton, CT USA利用UHPLC与
精确质量的AxION
2 TOF质谱仪联用
分析尿液中的
滥用药物

简介

常规采用免疫技术（EMIT）对滥用药物进行筛查，使用GC/MS或者LC/MS/MS检测技术进行确证。我们提出了一种替代的分析方法，利用时间飞行（TOF）质谱仪定量和确认这些药物。PerkinElmer®AxION® 2 TOF MS配有ADC检测器技术，提供了较宽的动态线性范围，非常适合于目标药物的定量分析。与全扫描模式不是很灵敏的四级杆仪器相比，TOF可用于未知化合物的定性筛查。AxION® 2 TOF MS提供的精确质量和同位素比例的信息，与保留时间一起，用于鉴定和确认已知及未知目标化合物的存在，且无需碎片的信息。AxION® 2 TOF MS配有双探头的Ultraspray™ 2 ESI离子源，允许同时注入已知质荷比的校准混合物和LC洗脱组分，因此，通过连续的锁定质量修正，使整个分析过程的质量精度保持在低ppm的水平。

实验

SPE萃取: 在空白的尿液样品中加入不同浓度的被分析药物 (1-10000ppb) 和内标物质 (d5-安定、d3-多虑平各50ng/mL)。尿液 (300 μL) 使用PerkinElmer的HLB固相萃取柱 (30 mg/1 mL 滤芯, 30 μm, 产品型号 N9306650)进行萃取。使用甲醇 (1mL), 水 (1mL) 依次淋洗萃取柱。然后加入尿液样品, 以1mL/min速度的流过萃取柱, 萃取柱使用5%的甲醇水溶液 (1mL) 冲洗, 在真空条件下抽干约1min, 然后使用甲醇 (1mL) 淋洗。淋洗液干燥后, 再使用300 μL 的水定溶。

LC条件	
泵:	PerkinElmer Flexar™ FX-10
流速:	0.4mL/min
流动相A:	0.1%甲酸水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度条件:	95%A / 5%B保持1min 随后的5min变为95%A / 5%B (线性梯度) 最后的1.5min, 维持10%A / 90%B
进样体积:	4 μL部分环注射模式
色谱柱:	PerkinElmer Brownlee™ SPP C-18, 2 X 50mm, 2.7 μm, 25 °C
MS条件	
质谱仪:	PerkinElmer AxION 2 TOF MS
离子源:	PerkinElmer Ultraspray™ 2 (双喷ESI源)
离子化模式:	阳离子
质谱扫描速率:	3 spectra/sec
毛细管出口电压:	100V
捕集脉冲模式:	100-1000 m/z (D7:68, D8:91)
内部校准使用m/z	118.08625 和622.02896作为锁定质量离子

结果

在7min之内完成21种不同类别的滥用药物分离、分析, 这些药物包括阿片类、苯二氮平类药物、安非他命和大麻 (图1)。几乎所有通过SPE萃取柱的被分析药物 (尿液中的加标浓度为20ppb) 回收率都≥ 80%。利用AxION® 2 TOF MS的专利捕集脉冲技术, 我们在分析多数药物 (1-5ppb, 表1) 时均获得了良好的检测限 (LODs, 基于S/N≥3)。在捕集脉冲的操作模式, TOF的占空率 (即离子利用率) 增加, 导致信号显著改善。AxION® 2 TOF MS测定的LODs比EMIT方法分析大多数滥用药物的极限水平要低100-400倍, 由此证明该仪器具有优越的灵敏度。

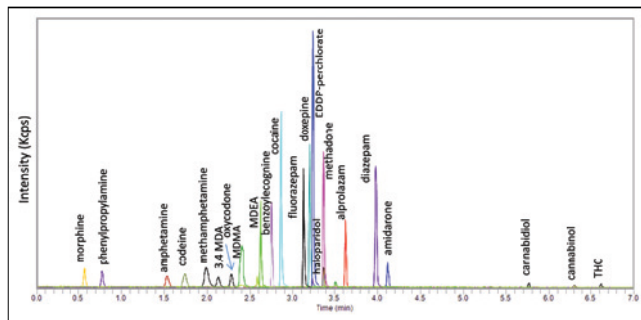


图1 7min分析不同类别的21种滥用药物

表1 人体尿液中一些典型的滥用药物的检测限

Drug	LOD in urine (ng/mL or ppb)
Methamphetamine	1
Amphetamine	5
Diazepam	1
Haloperidol	4
Alprazolam	1
Fluoroazepam	5
Codeine	5
Morphine	5
Doxepine	1
Haloperidol	4
Cocaine	1
Benzoyllecognine	1
Methadone	1
3, 4 MDA	1
MDEA	1
Oxycodone	1

代表性药物-氧可酮的线性响应如图2所示。线性相关系数 $r^2 = 0.999$, 5个数量级的动态范围, 从而进一步证明AxION 2 TOF MS的定量分析能力。

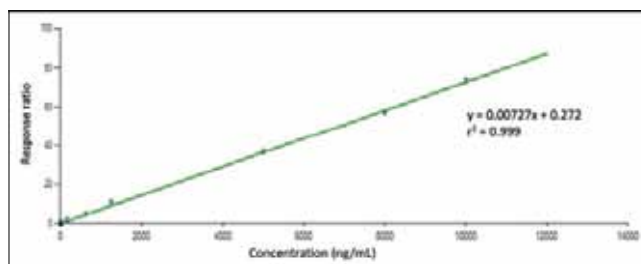


图2 浓度范围1-10000ppb氧可酮的回归曲线 (d3多虑平作为内标物质)

表2典型的滥用药物的理论质量, 采集质量和质量误差

Analyte	Formula	Monoisotopic Mass [M+H] ⁺	Observed Mass	Mass Error (ppm)
Methamphetamine	C ₁₀ H ₁₅ N	150.1277	150.1273	-2.66
Amidarone	C ₂₅ H ₂₉ I ₂ NO ₃	646.0310	646.0312	0.39
Amphetamine	C ₁₉ H ₁₃ N	136.1121	136.1113	-5.88
Codeine	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	300.1594	300.1594	-0.07
Diazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	285.0789	285.0792	0.98
Doxepine	C ₁₉ H ₂₁ NO	280.1696	280.1695	-0.36
Haloperidol	C ₂₁ H ₂₃ ClFN ₂ O	376.1474	376.1474	0.00
Morphine	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286.1438	286.1434	-1.40
Flurazepam	C ₂₁ H ₂₃ ClFN ₃ O	388.1586	388.1593	1.80
Alprolazam	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	309.0902	309.0900	-0.65
Cocaine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	304.1543	304.1550	2.30
EDDP perchlorate (fragment, [M-O ₄ Cl] ⁺)	C ₂₀ H ₂₄ ClNO ₄	278.1903	278.1906	1.08
Benzoyllecognine	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	290.1387	290.1394	2.41
Methadone	C ₂₁ H ₂₇ NO	310.2165	310.2171	1.93
3,4 MDA	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	180.1019	180.1016	-1.67
MDEA	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	208.1332	208.1326	-2.88
MDMA	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	194.1176	194.1169	-3.61
Phenylpropylamine	C ₉ H ₁₃ NO	152.1069	152.1060	-5.92
Oxycodone	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	316.1543	316.1545	0.54

TOF-MS的主要优势是提供准确的质量信息, 从而确认给定分析物的存在。表2罗列了AxION 2 TOF MS检测到的滥用药物的准确质量与理论质量。准确质量, 同位素比例和保留时间被用作确认已知分析物的存在。通过提取较窄离子质量的窗口, 尿液中分析物的检测限得到明显提升, 可低至ppb级, 如图3 (a-c) 安定的分析谱图所示。在较窄质量的窗口, 噪声显著减小, S/N全面增加, 因而对于已知化合物可提供更有信心的分析。

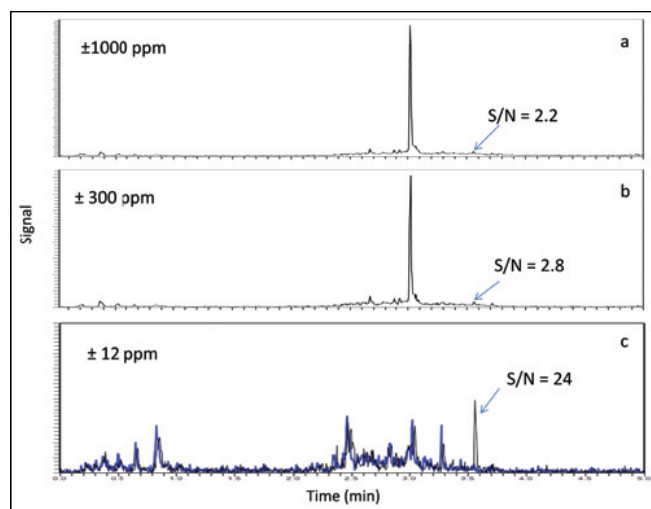


图3 (a-c) 尿液中1ppb安定提取较窄质量窗口对S/N作用。蓝色表示控制尿液样品, 黑色表示加标尿液

除政府限制的已知化合物的检测项目外, 法医毒理学者经常面临的挑战是寻找样品中的未知化合物。由于TOF采集的是全扫描数据, TOF MS技术使得用户可以再次利用已经采集的数据, 确定那些未知化合物的存在。例如, 我们分析了一个保留时间约为2.5min的未知化合物(图4)。利用AxION EC ID软件提供的准确质量和同位素比信息来鉴定该未知化合物。软件通过数据库检索, 获得了一个

给定元素组成的可能目标化合物的排序表, 该化合物被确定为咖啡因, 是一种最常规的兴奋剂。使用AxION EC ID软件进行类似的分析, 认为保留时间1和1.8min的两个未知化合物的最可能是可可碱/茶碱/副黄嘌呤, 这些化合物都是咖啡因代谢的异构体产物。通过与标准物质保留时间的匹配进一步确证咖啡因及其代谢产物在尿液中存在。

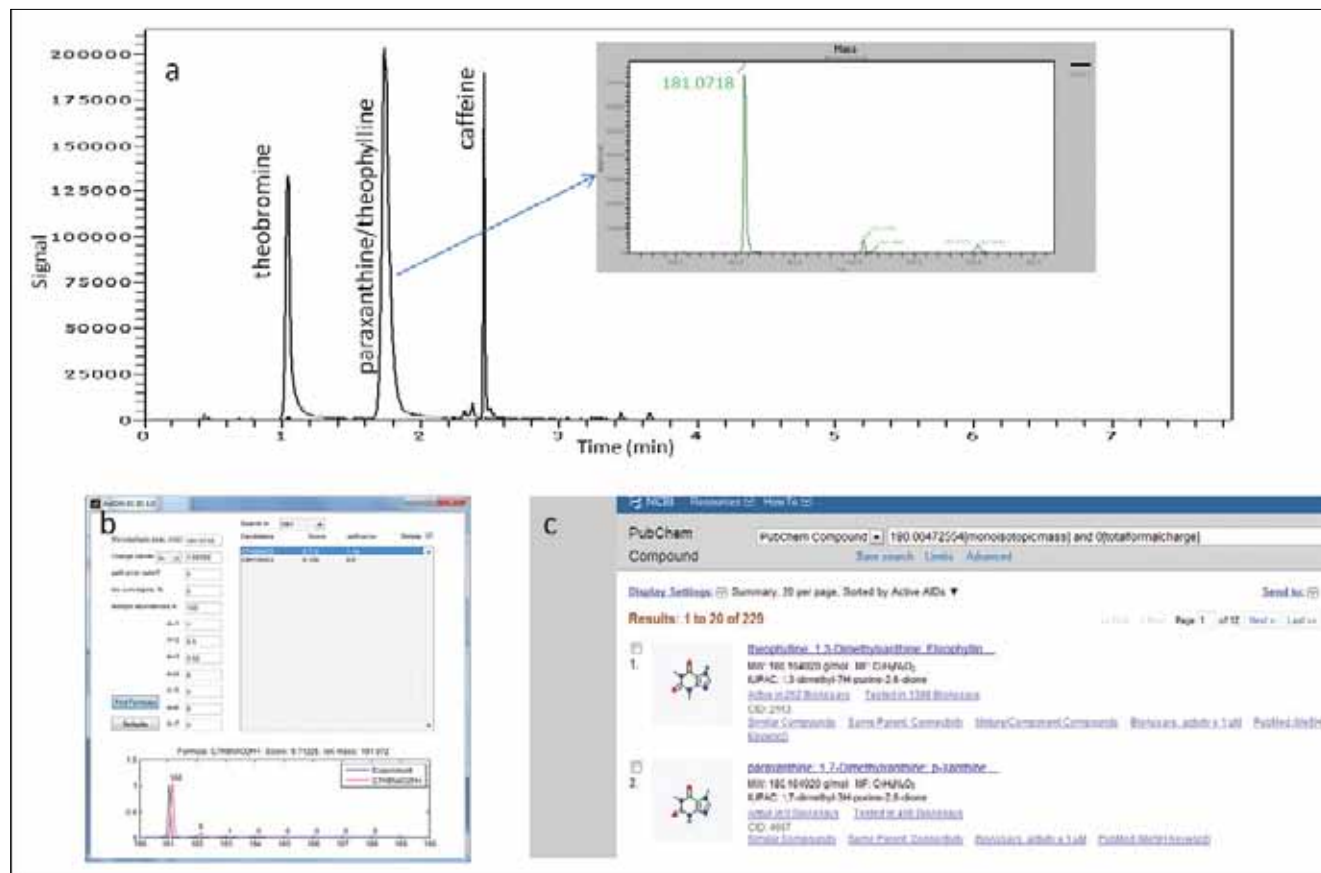


图4 插图a:利用AxION EC ID软件分析AxION 2 TOF MS采集的数据, 鉴定未知目标化合物是咖啡因及其代谢产物; 插图b:使用AxION EC ID软件, m/z181.0718匹配第一的元素组成是 $C_7H_8N_4O_2$; 插图c:为降低AIDS的排序, $C_7H_8N_4O_2$ 最可能的候选物是茶碱, 其次是副黄嘌呤, 两者都是咖啡因的代谢产物

本篇尿液中滥用药物分析的应用文献表明: AxION 2 TOF MS既可用于尿液的已知化合物的定量分析, 又可用于筛查尿液中存在的其它未知组分。TOF分析几类滥用药物的检测限比对应的非特异性免疫的分析方法低100-400倍。与三重四级杆的仪器相比, AxION 2 TOF MS除了具有宽的动态定量范围外, 也可提供全扫描的信息, 这可用于非目标化合物的筛查。本应用文献建立了21种滥用药物的分析方法, 然而, 该方法在仪器提供的易于定量和报告的软件包的帮助下, 可容易的被应用到更广泛的滥用药物筛查中。

参考文献

1. Moeller, K.E., Lee, K.C., Kissack, J.C., Mayo Clin. Proc. 83 (2008) 66.
2. Thevis, M., Schanzer, W., *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007) 79.
3. Gallardo E., Barroso, M., Queiroz, J.A., *Drug Test Anal.* 1 (2009) 109.

PerkinElmer, Inc.

珀金埃尔默仪器(上海)有限公司
地址: 上海 张江高科技园区 张衡路1670号
邮编: 201203
电话: 021-60645888
传真: 021-60645999
www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表, 请访问[http:// www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs](http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs)

版权所有 ©2012, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自持有者或所有者的财产。