

## 使用Ostro™直通式样品制备板测定全血中的滥用药物

---

Michelle Wood, Emily Lee

Waters Corporation

仅适用于法医毒理学应用。

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

---

### 摘要

多年来，使用全血作为法医检测的生物基质一直很流行。由于全血被视为一种复杂基质，因此任何分析工作流程都应包括稳定的样品制备方法。本文介绍了一种简单的直通式样品制备方法，该方法已应用于大量不同化学类别的药物测定，并将支持一系列法医毒理学检测场景。

### 优势

- 使用Ostro直通式样品制备板的一套通用样品制备方案
- 只需一套装置即可完成沉淀、过滤和样品净化步骤
- 使用ACQUITY UPLC I-Class在BEH™ C<sub>18</sub> ACQUITY™ UPLC或HSS C<sub>18</sub> ACQUITY色谱柱上分离多类药物
- Xevo™ TQ-S micro质谱仪具有优异的灵敏度，能够检出毒理学相关浓度的分析物

---

## 简介

法医毒理学涉及对生物学标本中药物或有毒物质的调查。为此，实验室需要采用可靠的方法来检测死后和死前标本中的各种此类毒物。

多年来，使用全血作为法医检测的生物基质一直很流行。例如，它是调查可能死因的优选基质，此类调查的分析方案通常涉及应用通用的未知筛选程序（也称为“系统毒理学分析”），旨在筛查潜在的数百种异生物质。这些异生物质可能是禁用或违禁药物、新型精神活性物质或处方药和非处方药。

血液也是确证分析中十分常用的样本，此类分析会怀疑最近有药物摄入，例如对酒后驾驶(DUID)的调查，因为血液中药物的定量测量被认为有助于准确了解目前药物对身体的影响（已知某些血药浓度与损伤密切相关）。由于酒后驾驶是全球关注的重大问题，全球大多数国家/地区目前都制定了改善道路安全和减少机动车事故的法律。此类分析通常涉及监测一组既定的具体药物。例如，英格兰和威尔士的分析方法目前针对一组17种具体药物，以支持1988年《道路交通安全法》第5A节的要求<sup>1</sup>，而美国国家安全委员会的药物和损害部门推荐了一组他们认为对驾驶员监测至关重要的化合物（第1级化合物），因为这些物质经常在与危险驾驶有关的逮捕行动中发现<sup>2</sup>。但是，由于人们意识到还有许多其他药物或联用药物可能造成损害风险，因此随着各个国家/地区持续调整其监测驾驶员的检测方案和建议，对更广泛的物质组进行更全面的检测也受到关注，具体取决于特定地区使用/开具处方的药物及其使用率。

法医相关物质可能相当多样化，涵盖不同的化学类别，从极性碱（例如阿片类药物和安非他命类药物）到非极性酸（例如甾体抗炎药）均包括在其中，因此在监测这些物质时，实验室需要使用一种通用的样品制备方法，从全血中提取所有这些不同化学类别的物质，同时仍然需要在使用UPLC™-MS/MS等高灵敏度分析程序之前对样品进行一定程度的净化。

之前，我们已经介绍了一种基于Waters Ostro直通式样品制备板的简单的全血净化方案<sup>3</sup>。Ostro将蛋白质和磷脂的去除与过滤结合在一套装置中。将该方法与UPLC-MS/MS方法相结合，用于分析一组特定的17种药物，以支持1988年英格兰和威尔士《道路交通安全法》第5A节的具体要求。在本研究中，我们将相同的方案应用于更广泛的药物组，为更广泛的法医检测场景提供支持。

---

## 实验

---

人全血对照品 (K2 EDTA, 混合样品) 由Bio-IVT (英国西萨塞克斯郡布杰斯希尔) 提供。

毒理学相关物质的标准品购自Merck (英国多塞特郡普尔)、LGC (英国伦敦特丁顿), 分别以1mg/mL甲醇或乙腈溶液提供。将分析物合并, 在甲醇中制得几种混合药物加标溶液。

向全血对照品中添加一系列药物, 所涵盖的组和浓度如下: 在正离子电喷雾模式(ESI+)下电离的分析物加标浓度为100 ng/mL; 在负离子电喷雾模式(ESI-)下电离的分析物加标浓度为200 ng/mL; 大麻素加标浓度为10 ng/mL。如先前所述, 制备血液等分试样<sup>3</sup>。简单来讲, 就是将一份(100 µL)对照品或加标血液加入Ostro样品制备96孔板(P/N: 186005518 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/186005518-ostro-protein-precipitation--phospholipid-removal-plate-25-mg-1-.html>> )的孔中 (已经有100 µL硫酸锌/乙酸铵溶液), 并简单混合。将洗脱溶剂 (600 µL 0.5%甲酸的乙腈溶液) 加入孔中, 并将样品板涡旋混合3分钟。将样品板置于真空提取萃取装置上, 并将洗脱溶剂吸入沃特世2 mL方孔收集板(P/N: 186002482 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002482-96-well-sample-collection-plate-2-ml-square-well-50-pk.html>> )中。将三份单独的洗脱液(3 × 150 µL)转移到圆孔收集板(P/N: 186002481 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002481-96-well-sample-collection-plate-800--l-round-well-50-pk.html>> )中, 并使用Ultravap Mistral微孔板蒸发器(Porvair)干燥。加入50 µL适合样品分析所用特定UPLC-MS/MS方法的溶剂, 复溶干燥孔内的物质, 如下文所详述。

使用ACQUITY HSS C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 × 150 mm, 1.8 µm, P/N: 186003534 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186003534-acquity-uplc-hss-c18-column-100a-18--m-21-mm-x-150-mm-1-pk.html>> ), 以包含0.1%甲酸的水溶液和乙腈溶液为流动相, 通过UPLC-MS/MS方法分析在ESI+模式下电离的药物。该分析的复溶溶剂为包含0.1%甲酸的5%乙腈溶液。

使用相同的ACQUITY HSS C<sub>18</sub>色谱柱分析在ESI-模式下电离的药物, 但流动相改为0.001%甲酸的水溶液和0.001%甲酸的乙腈溶液。该分析的复溶溶剂为包含0.001%甲酸的10%乙腈溶液。

大麻素的测量采用另一种方法, 即使用ACQUITY BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 × 100 mm, 1.7 µm; P/N: 186002352 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186002352-acquity-uplc-beh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html>> ), 流动相为0.05%甲酸的水溶液 (流动相A) 和0.05%甲酸的乙腈溶液 (流动相B)。该分析的复溶溶剂为0.05%甲酸的乙腈溶液。

每种UPLC-MS/MS方法均对每种分析物监测2个MRM通道 (如有可能)。

# 结果与讨论

使用开发的样品制备程序考察了总共155种分析物，这些分析物包括在ESI+模式下使用广泛的MRM筛查方法分析的110种物质、在ESI-模式下使用广泛的MRM筛查方法分析的40种物质，以及使用在ESI+/ES-之间切换的专用MRM检测的5种大麻素。

本研究中考察的所有物质均在所考察的浓度下检出，并列于表1中。

|           |            |             |           |       |       |        |
|-----------|------------|-------------|-----------|-------|-------|--------|
| 6-MAM     | 去甲氯氮平      | 劳拉西洋        | 去甲哌替啶     | 替马西洋  | 非洛地平  | 羧基 THC |
| 7-氨基氯硝西洋  | 可卡乙碱       | 氯甲西洋        | 去甲替林      | 疏利达嗪  | 苯氧苯丙酸 | 大麻酚    |
| 乙酰可待因     | 可卡因        | LSD         | 奥沙西洋      | 噻吗洛尔  | 氟灭酸   | 大麻二酚   |
| 阿普唑仑      | 可待因        | 马普替林        | 奥沙西洋葡萄糖苷酸 | 曲马多   | 氟伐他汀  | 羟基 THC |
| 阿普洛尔      | 可待因葡萄糖苷酸   | MDA         | 氧烯洛尔      | 曲唑酮   | 呋塞米   | THC    |
| 胺碘酮       | 地西洋        | MDEA        | 羟考酮       | 苯丙烯啶  | 氯氯噻嗪  |        |
| 阿米替林      | 双氢可待因      | MDMA        | 羟吗啡酮      | 文拉法辛  | 氯氯噻嗪  |        |
| 安非他命      | 双氢可待因葡萄糖苷酸 | 哌替啶         | 扑热息痛      | 维拉帕米  | 布洛芬   |        |
| 阿替洛尔      | 多沙普伦       | 甲氧麻黄酮       | 帕罗西汀      | 唑吡坦   | 吲哚美辛  |        |
| 阿托品       | 多虑平        | 甲丙氨酯        | PCP       | 佐匹克隆  | 酮洛芬   |        |
| 溴苯那敏      | 芽子碱甲酯      | 美沙酮         | 奋乃静       | 乙酰唑胺  | 美托拉宗  |        |
| 丁丙诺啡      | EDDP       | 甲基苯丙胺       | 苯甲吗啉      | 异戊巴比妥 | 蔡普生   |        |
| 丁丙诺啡葡萄糖苷酸 | 依那普利       | 甲基酮         | PMMA      | 巴比妥   | 帕瑞昔布  |        |
| 苯甲酰芽子碱    | 麻黄碱        | 咪达唑仑        | 扑米酮       | 苄氯噻嗪  | 戊巴比妥  |        |
| 咖啡因       | 乙基酮        | 吗啡          | 丙环定       | 苄噻嗪   | 苯巴比妥  |        |
| 卡立普多      | 芬太尼        | 吗啡葡萄糖苷酸     | 心得安       | 苯扎贝特  | 苯妥英   |        |
| 西替利嗪      | 氯硝西洋       | 纳多洛尔        | 丙氧芬       | 布美他尼  | 吡罗昔康  |        |
| 氯氮卓       | 氯西汀        | 纳曲酮         | 普罗替林      | 仲丁巴比妥 | 普伐他汀  |        |
| 氯喹        | 氯西洋        | 硝苯地平        | 雷米普利      | 布他比妥  | 丙磺舒   |        |
| 氯苯那敏      | 加巴喷丁       | 硝西洋         | 雷尼替丁      | 塞来昔布  | 罗非昔布  |        |
| 去甲西酞普兰    | 格列齐特       | 去甲丁丙诺啡      | 羟基利培酮     | 氯噻嗪   | 水杨酸   |        |
| 西酞普兰      | 氟哌啶醇       | 去甲丁丙诺啡葡萄糖苷酸 | 莨菪碱       | 氯噻酮   | 司可巴比妥 |        |
| 氯巴占       | 氢可酮        | 去甲地西洋       | 舍曲林       | 氯噻沙宗  | 替诺昔康  |        |
| 氯硝西洋      | 氢吗啡酮       | 去甲芬太尼       | 西地那非      | 环噻嗪   | 硫喷妥   |        |
| 氯氮平       | 氯胺酮        | 去甲氯胺酮       | 索他洛尔      | 依托度酸  | 托伐普坦  |        |

表1.使用直通式*Ostro*程序评估的物质；绿色阴影部分的化合物是在ESI+模式下使用MRM筛查分析的。蓝色阴影部分的物质是使用ESI-筛查方法分析的。大麻素（粉色阴影部分）是单独使用包含ESI+/ESI-切换的专用方法分析的

图1展示了包含20种物质的典型混合物示例，这些物质在全血中的制备浓度为10 ng/mL，使用所述的直通式样品制备方法制备得到，并使用UPLC-MS/MS在ESI+模式下进行分析。图2展示了包含加标浓度为200 ng/mL的负电离化合物混合物的血液分析结果，图3展示了全血中加标浓度为10 ng/mL的大麻素的结果色谱图。

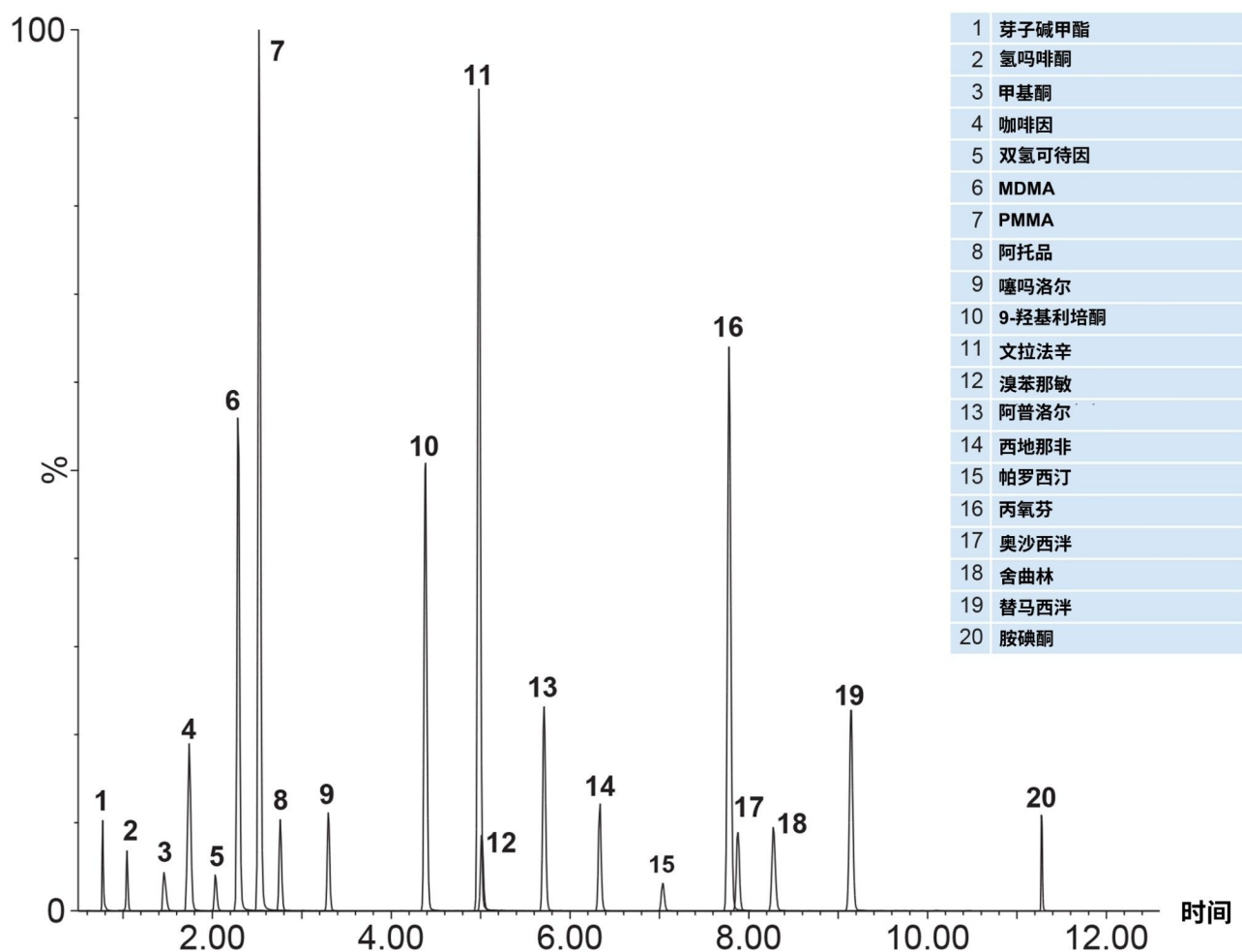


图1.全血中加标浓度为10 ng/mL并使用所述Ostro直通式程序制备的正电离化合物的代表性结果。叠加MRM色谱图并将响应归一化至丰度最高的峰。

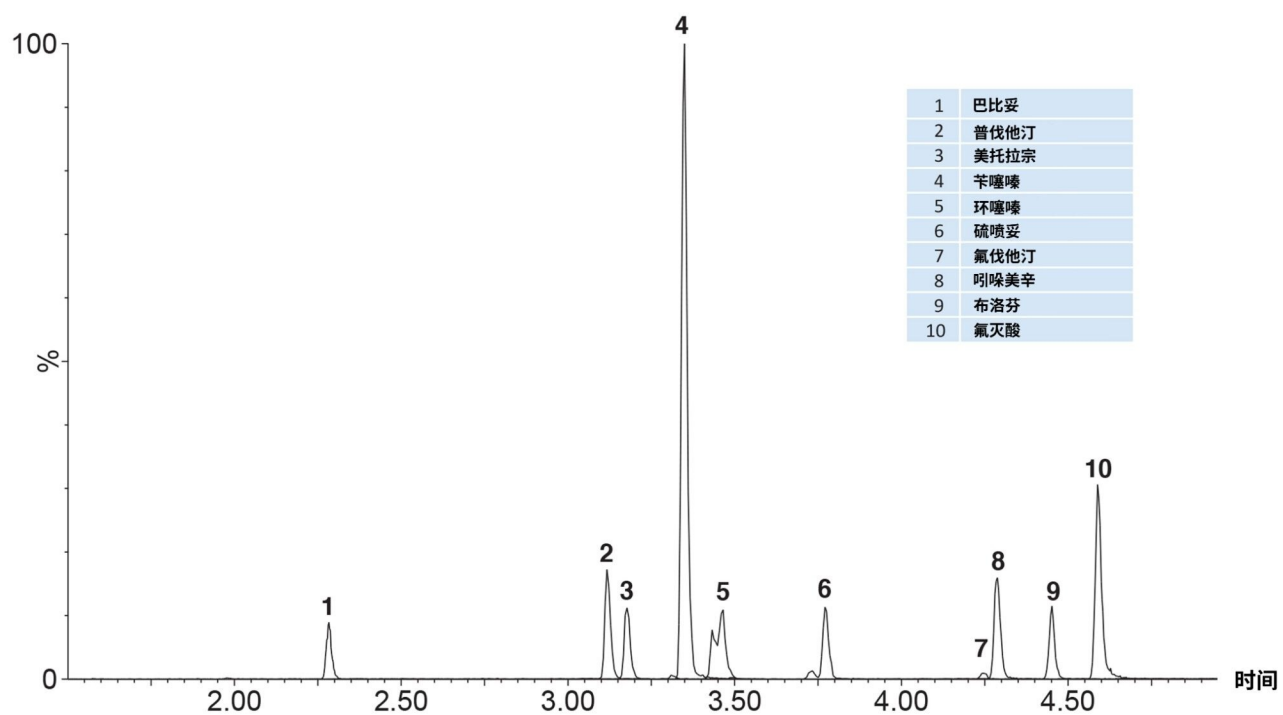


图2.全血中加标浓度为200 ng/mL并使用Ostro制备的负电离化合物的代表性结果。叠加MRM色谱图并将响应归一化至丰度最高的峰。

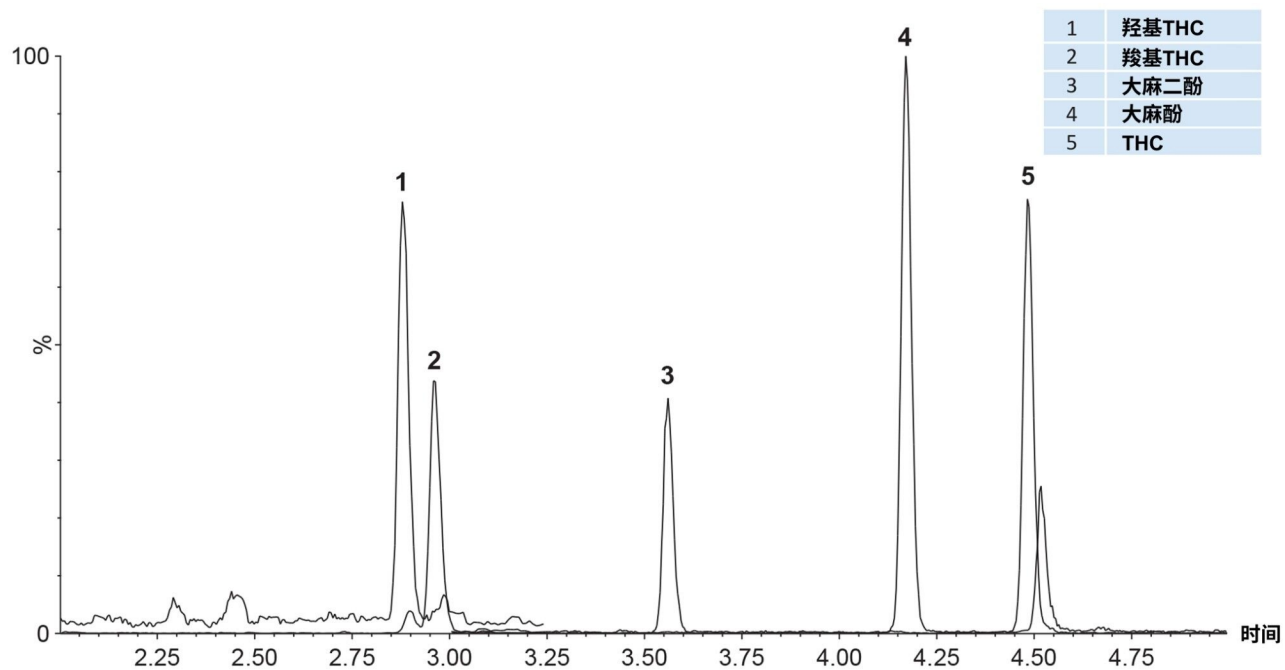


图3.全血中的大麻素(10 ng/mL)。除在ESI-模式下检测羧基THC外，所有分析物均在ESI+模式下进行检测。叠加MRM色谱图并将响应归一化至丰度最高的峰。

## 结论

随着药物检测中全血使用的增加，业界也愈加需要快速、准确、可靠和稳定的化合物筛查方法。本文详细介绍了一种简单而可靠的样品制备程序，该程序已成功应用于全血中大量化学性质多样的药物测定。这种通用的样品制备方法可能适用于广泛的检测场景。

直通式样品净化程序采用微孔板形式，因此如果需要高样品通量，还可以自动化完成。

## 参考资料

1. Drug Driving (Specified Limits) (England and Wales) Regulations 2014 and the Drug Driving (Specified Limits) (England and Wales) (Amendment) Regulations 2015.
2. Recommendations for Toxicological Investigation of Drug-Impaired Driving and Motor Vehicle Fatalities—2021 Update. A.L. D' Orazio *et al.*, *J. Anal. Toxicol.*, 45: 529-536 (2021).
3. M. Wood, R. Lee. 开展血药分析以支持英国《道路交通法》第5A节关于“药驾”的要求. 应用纪要, [720007451ZH](#), 2021.

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007699ZH, 2022年8月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#)

[隐私](#)

[商标](#)

[网站地图](#)

[招聘](#)

[Cookie](#)

[Cookie](#)

[设置](#)