

在法医毒理学研究中使用简单的“稀释-上样”方法对尿液中的镇痛药物和滥用药物进行UPLC-MS/MS分析

Robert Wardle, Gareth Hammond

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

仅适用于法医毒理学应用。

摘要

本应用简报介绍了在法医毒理学研究中使用简单的“稀释-上样”方法进行镇痛药物和滥用药物的UPLC-MS/MS分析，并针对沃特世应用纪要[720006187ZH](#)中描述的方法提供了一种替代方案。样品前处理过程从SPE简化到只需一步稀释，与此同时仍能保持极低的残留、一致的基质效应和精确的定量数据，使组内大多数分析物都能达到所需的分析灵敏度。如果化合物对分析灵敏度的要求更高，则建议进一步净化样品，如原始应用纪要所述。

ACQUITY™ UPLC™ BEH™ C₁₈色谱柱可以快速分析大量化合物，同时保持所需的分离度，确保不受同分异构体化合物的干扰。

Waters™ Xevo™ TQ-S micro IVD能在较宽的动力学范围内准确定量大量分析物，少至2 ng/mL，多至2500 ng/mL的分析物都能同时定量。



图1.ACQUITY™ UPLC™ I-Class FL IVD和Xevo TQ-S micro IVD质谱仪

样品萃取、色谱分离与MS/MS检测相结合，得到一套简单的工作流程方法，既快速又精确，还可以在Hamilton STAR或STARlet系统上自动化运行。

优势

- 通过快速、简单的方法分析一组全面的确证药物
- 采用简单的“稀释-上样”样品萃取方法
- 一致的基质效应和回收率，残留极低
- 精确定量大量确证药物

简介

在法医毒理学研究中使用简单的“稀释-上样”方法对尿液中的镇痛药物和滥用药物进行UPLC-MS/MS分析

在法医毒理学分析中，分析物组通常包括违禁药物和常见的滥用药物。通常，研究人员使用多种方法获取多种药物的全面信息。这些方法可包括免疫分析、GC-MS、LC-MS/MS或组方法。沃特世开发了一种用于定量分析综合性药物组的方法，以获得适当的分析灵敏度、选择性和准确度，从而在法医毒理学中实现明确鉴定。

该方法采用“稀释-上样”方法和ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱，通过简单的样品萃取方案以及快速、可重现的色谱方法，使所有存在潜在干扰的关键分析物对均能实现基线分离。Waters Xevo TQ-S micro IVD质谱仪具有Xtended Dynamic Range (XDR)功能，能够提供多种化合物所需的分析灵敏度和动态范围。尽管该方法已被证明能够为镇痛药物和滥用药物提供合适的结果，但由于采用的是简化的“稀释-上样”工作流程，因此在分析灵敏度方面也存在一定局限性。如果只有少数分析物对分析灵敏度的要求不高，则建议进一步净化样品，如沃特世应用纪要720006187ZH中所述。

实验

样品萃取

所有标准品均购自Cerilliant (Merck Life Sciences, 英国吉林汉姆)、Toronto Research Chemicals (安大略省北约克)和Cambridge Biosciences UK (英国剑桥)。用甲醇配制浓度为2、10和25 µg/mL的混合储备液，具体取决于分析物种类。用50/50 (v/v)甲醇/水配制浓度为100 ng/mL的内标工作溶液。除氯硝西泮、去氢去甲氯胺酮、甲沙酮、去甲羟吗啡酮和α-吡咯烷戊苯酮(α-PVP)代谢物1外（这些化合物不容易获得稳定标记的内标），其余所有化合物均使用了稳定同位素标记的内标。稀释储备液，然后将稀释液添加到混合的空白尿液中，制备标样。同样，稀释储备液，然后将稀释液添加到混合的空白尿液中，制备质控(QC)样品。附录1列出了所有分析物的保留时间和标准曲线范围。

在样品萃取时，可以利用Hamilton液体处理机器人实现半自动化，使样品从样品管条形码到处理样品的每一个环节均可追踪。

取25 µL尿液样品转移至沃特世700 µL圆形96孔收集板中，加入内标工作溶液并充分混合。在进样到UPLC-MS/MS系统之前，用蒸馏水/甲酸溶液稀释并混合样品。

液相色谱条件

液相色谱系统：

ACQUITY UPLC I-ClassFL IVD

色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 1.7 μm, 2.1 x 100 mm
柱温：	40 °C ± 2 °C报警
进样体积：	20 μL
流动相A：	0.1%甲酸的水溶液
流动相B：	含0.1%甲酸的乙腈溶液

质谱条件

质谱系统：	Xevo TQ-S microIVD
电离模式：	ESI+
毛细管电压：	0.8 kV

锥孔电压、碰撞能量和多重反应监测(MRM)通道等MS方法参数见附录1。

数据管理

MS软件：	MassLynx
信息学软件：	TargetLynx™

结果与讨论

色谱分析

附录1中列出了所有测试目标化合物的保留时间窗口和标准曲线范围。图2显示了所有化合物的叠加色谱分离图，图3显示了几组可能相互干扰的分析物的色谱图，如下文所列。

吗啡和氢吗啡酮	甲沙酮和MDMA
去氢去甲氯胺酮、乙基酮和丁基酮	可待因和氢可酮
纳洛酮和6-乙酰吗啡	双氢可待因和去甲羟考酮
甲基苯丙胺和苯丁胺	去甲哌替啶和PVP代谢物1

上述所有示例要么实现了基线色谱分离，要么采用了选择性MRM，因此这些化合物不会彼此干扰。由于本文所述的稀释法对样品净化的选择性较低，因此UPLC分离相较于应用纪要720006187ZH中略有修改。在梯度开始时设置一段临时保持时间，以便在分析物从色谱柱中洗脱之前，将盐和其他基质组分转移至废液。

每次分析均萃取两份七点标准曲线样品，较高浓度范围为25~2,500 ng/mL，中等浓度范围为10~1,000 ng/mL，较低浓度范围为2~200 ng/mL，详见附录1。所有标准曲线的相关系数(r^2)均>0.99，至少75%的校正点在标称值的±15%范围内（标准曲线样品1为±20%），但N-去甲基佐匹克隆、去甲丙氧芬和佐匹克隆除外，这些化合物需要进一步研究，以确定在制备标准曲线样品时是否可以提高溶解度/稳定性。仅对N-去甲基佐匹克隆、去甲丙氧芬和佐匹克隆进行定性监测。

QC样品的较高浓度范围为25、75、187.5和1875 ng/mL，中等浓度范围为10、30、75和750 ng/mL，较低浓度范围为2、6、15和150 ng/mL，详见附录1。在运行的所有分析中，至少66%的QC样品在标称值的±15%范围内（QC1为±20%）。

精密度性能

在五个不同的条件下，每种QC样品（浓度如上所述）重复萃取和分析五次（n=25次重复分析），评估方法精密度。图4a-4d显示了每个QC浓度下获得的结果汇总。

分析灵敏度

在四个不同的条件下，萃取并分析浓度等于或低于标准曲线样品1的低浓度样品，每种样品10个重复样，计算%CV。大多数分析物的%CV < 20%，达到可接受标准。如果劳拉西洋、6-乙酰吗啡、 α -羟基阿普唑仑、 α -羟基三唑仑、纳洛酮、纳曲酮和普瑞巴林不符合可接受标准，但又要求更低的浓度，则建议采用沃特世应用纪要 [720006187ZH](#)中所述的样品萃取方法。

残留

在比较六个空白基质样品的平均值与浓度为标准曲线样品7两倍浓度的样品时，除了7-氨基氯硝西洋和7-氨基氟硝西洋外，其余所有分析物均未观察到显著的残留效应；这两种物质的峰面积均为标准曲线样品1峰面积的38.8%。如需评估这些分析物达到残留效应可忽略的浓度，还需要进一步测试。

基质因子

在比较从六个不同供体提取的尿液样品与水溶液对照样品，以及低浓度和高浓度加标的样品时，除了苯丙胺和去甲羟吗啡酮之外，其余所有分析物的基质因子均在0.85~1.15之间（基质效应在15%以内）。所有分析物的基质因子数据汇总见附录2。

结论

本应用简报介绍了法医毒理学研究中镇痛药物和滥用药物的UPLC-MS/MS分析概述。样品前处理流程简化为“稀释-上样”步骤，以便实施快速萃取技术。本研究所用的方法将UPLC分离与Xevo TQ-S micro IVD检测联用，能够分析大量镇痛药物和滥用药物。这个大型组中的大多数分析物都获得了高精密度的结果、一致的基质效应和极低的残留。但对于某些化合物，建议使用更彻底的样品萃取技术，以提高分析灵敏度，如沃特世应用纪要 [720006187ZH](#)中所述。

参考资料

1. Danaceau JP, Freeto S, Calton L. 结合简单快速混合模式的SPE与UPLC-MS/MS分析镇痛药物和滥用药物用于法医毒理学研究.沃特世应用纪要, [720006187ZH](#).2019年3月.

2. Rosano TG, Rumberger JM, Wood M. Matrix Normalization Techniques for Definitive Urine Drug Testing. *Journal of Analytical Toxicology*, 2021;45:901–912.

附录1

化合物	MRM (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (kV)	时间窗口 (min)	浓度范围 (ng/mL)
安非他命	136.1>119.1 (91.1)	10	6 (14)	1.75–2.15	25–2500
[² H ₁₁]-安非他命	147.1>130.1 (97.1)	10	6 (14)		(25, 75, 187.5, 1875)
MDA	180.2>163.1 (105.1)	10	6 (20)	1.85–2.25	25–2500
[² H ₅]-MDA	185.2>168.1 (110.1)	10	6 (20)		(25, 75, 187.5, 1875)
MDEA	208.2>163.1 (105.1)	10	10 (24)	2.10–2.50	25–2500
[² H ₅]-MDEA	213.2>163.1 (105.1)	10	10 (24)		(25, 75, 187.5, 1875)
MDMA	194.2>163.1 (105.1)	10	10 (22)	1.95–2.45	25–2500
[² H ₅]-MDMA	199.2>165.1 (105.1)	10	10 (22)		(25, 75, 187.5, 1875)
甲基苯丙胺	150.1>91.1 (119.1)	10	6 (14)	1.90–2.30	25–2500
[² H ₁₄]-甲基苯丙胺	164.1>98.1 (130.1)	10	6 (14)		(25, 75, 187.5, 1875)
苯丁胺	150.1>133.1 (91.1)	10	8 (14)	2.05–2.45	25–2500
[² H ₅]-苯丁胺	155.1>138.1 (96.1)	10	8 (14)		(25, 75, 187.5, 1875)
阿普唑仑	309.2>205.1 (281.1)	25	40 (24)	3.90–4.30	10–1000
[² H ₅]-阿普唑仑	314.2>210.1 (286.1)	25	40 (24)		(10, 30, 75, 750)
氯硝西泮 (使用[² H ₅]-阿普唑仑作为内标)	316.2>270.1 (241.1)	25	32 (22)	3.80–4.20	10–1000 (10, 30, 75, 750)
地西泮	285.2>154.1 (193.1)	25	25 (28)	4.40–4.80	10–1000
[² H ₅]-地西泮	290.2>154.1 (198.1)	25	25 (28)		(10, 30, 75, 750)
氟硝西泮	314.2>268.1 (239.1)	25	25 (28)	4.05–4.45	10–1000
[² H ₇]-氟硝西泮	321.2>275.1 (246.1)	25	25 (28)		(10, 30, 75, 750)
劳拉西泮	323.2>277.1 (229.1)	25	16 (25)	3.85–4.25	10–1000
[² H ₄]-劳拉西泮	327.2>281.1 (233.1)	25	16 (25)		(10, 30, 75, 750)
硝西泮	282.2>236.1 (180.1)	25	20 (35)	3.65–4.05	10–1000
[² H ₅]-硝西泮	287.2>241.1 (185.1)	25	20 (35)		(10, 30, 75, 750)
奥沙西泮	289.2>243.1 (104.1)	25	18 (35)	3.80–4.20	10–1000
[² H ₅]-奥沙西泮	294.2>248.1 (109.1)	25	18 (35)		(10, 30, 75, 750)
替马西泮	301.2>255.1 (177.1)	25	18 (35)	4.15–4.55	10–1000
[² H ₅]-替马西泮	306.2>260.1 (177.1)	25	18 (35)		(10, 30, 75, 750)
苯甲酰芽子碱	290.2>168.1 (105.1)	35	12 (25)	2.20–2.60	10–1000
[² H ₈]-苯甲酰芽子碱	298.2>171.1 (110.1)	35	12 (25)		(10, 30, 75, 750)
可卡乙碱	318.2>196.1 (105.1)	25	16 (30)	2.85–3.25	10–1000
[² H ₈]-可卡乙碱	326.2>204.1 (105.1)	25	16 (30)		(10, 30, 75, 750)
可卡因	304.2>182.1 (82.1)	25	16 (26)	2.60–3.00	10–1000
[² H ₃]-可卡因	307.2>185.1 (85.1)	25	16 (26)		(10, 30, 75, 750)
6-乙酰基吗啡	328.2>165.1 (211.1)	25	35 (22)	1.85–2.25	2–200
[² H ₆]-6-乙酰基吗啡	334.2>165.1 (211.1)	25	35 (22)		(2, 6, 15, 150)

化合物	MRM (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (kV)	时间窗口 (min)	浓度范围 (ng/mL)
纳洛酮	328.2>253.1 (212.1)	25	22 (35)	1.65–2.05	10–1000 (10, 30, 75, 750)
[² H ₅]-纳洛酮	333.2>258.1 (212.1)	25	22 (35)		
6β-纳曲醇	344.2>308.1 (254.1)	10	25 (30)	1.85–2.25	10–1000 (10, 30, 75, 750)
[² H ₃]-6β-纳曲醇	347.2>311.1 (254.1)	10	25 (30)		
纳曲酮	342.2>270.1 (324.1)	25	22 (16)	1.85–2.25	10–1000 (10, 30, 75, 750)
[² H ₃]-纳曲酮	345.2>270.1 (327.1)	25	22 (16)		
去甲丁丙诺啡	414.3>101.1 (83.1)	25	35 (45)	2.75–3.15	2–200 (2, 6, 15, 150)
[² H ₃]-去甲丁丙诺啡	417.3>101.1 (83.1)	25	35 (45)		
去甲地西洋	271.2>140.1 (165.1)	60	25 (25)	3.85–4.25	10–1000 (10, 30, 75, 750)
[² H ₃]-去甲地西洋	276.2>140.1 (165.1)	60	25 (25)		
去甲芬太尼	233.2>84.1 (177.1)	25	14 (10)	2.20–2.60	2–200 (2, 6, 15, 150)
[² H ₃]-去甲芬太尼	238.2>84.1 (182.1)	25	14 (10)		
甲氢可酮	286.2>199.1 (171.1)	25	24 (34)	1.85–2.25	10–1000 (10, 30, 75, 750)
[² H ₃]-去甲氢可酮	289.2>202.1 (174.1)	25	24 (34)		
去甲氯胺酮	224.2>125.1 (179.1)	10	20 (14)	2.15–2.55	2–200 (2, 6, 15, 150)
[² H ₄]-去甲氯胺酮	228.2>129.1 (183.1)	10	20 (14)		
去甲哌替啶	234.2>160.1 (131.1)	25	12 (20)	2.65–3.05	10–1000 (10, 30, 75, 750)
[² H ₄]-去甲哌替啶	238.2>164.1 (135.1)	25	12 (20)		
去甲羟考酮	302.2>187.1 (227.1)	25	20 (25)	1.80–2.20	10–1000 (10, 30, 75, 750)
[² H ₃]-去甲羟考酮	305.2>190.1 (230.1)	25	20 (25)		
去甲羟吗啡酮 (使用[² H ₃]-羟吗啡酮作为内标)	288.2>213.1 (173.1)	10	25 (20)	1.20–1.60	10–1000 (10, 30, 75, 750)
去甲丙氧芬	326.2>252.1 (118.1)	10	5 (5)	3.55–3.95	仅监测
[² H ₅]-去甲丙氧芬	331.2>257.1 (118.1)	10	5 (5)		
羟考酮	316.2>298.1 (241.1)	25	15 (25)	1.85–2.25	25–2500 (25, 75, 187.5, 1875)
[² H ₃]-羟考酮	319.2>301.1 (244.1)	25	15 (25)		
羟吗啡酮	302.2>227.1 (242.1)	25	25 (22)	1.30–1.70	25–2500 (25, 75, 187.5, 1875)
[² H ₃]-羟吗啡酮	305.2>230.1 (245.1)	25	25 (22)		
苯环己哌啶(PCP)	244.2>86.1 (159.1)	10	10 (12)	2.95–3.35	10–1000 (10, 30, 75, 750)
[² H ₅]-苯环己哌啶(PCP)	249.2>86.1 (164.1)	10	10 (12)		
普瑞巴林	160.2>125.1 (107.1)	10	10 (14)	1.70–2.10	10–1000 (10, 30, 75, 750)
[² H ₆]-普瑞巴林	166.2>131.1 (112.1)	10	10 (14)		
丙氧芬	340.2>266.1 (143.1)	10	20 (6)	3.60–4.00	10–1000 (10, 30, 75, 750)
[² H ₅]-丙氧芬	345.2>271.1 (147.1)	10	20 (6)		
利他林酸	220.2>84.1 (56.1)	25	15 (38)	2.15–2.55	25–2500 (25, 75, 187.5, 1875)
[² H ₁₀]-利他林酸	230.2>93.1 (61.1)	25	15 (38)		

化合物	QC1 (%CV)		QC2 (%CV)		QC3 (%CV)		QC4 (%CV)		基质因子 (范围)
	批次内精密度	总精密度	批次内精密度	总精密度	批次内精密度	总精密度	批次内精密度	总精密度	
氢可酮	8.12	14.58	5.15	5.41	6.96	8.43	4.82	5.76	0.97 (0.88–1.01)
氢吗啡酮	5.40	8.61	6.57	6.94	4.90	5.83	6.86	7.79	0.97 (0.84–1.12)
α -羟基阿普唑仑	14.72	27.01	14.89	18.84	6.23	8.26	4.92	6.72	0.98 (0.85–1.14)
2-羟基乙基氟西洋	10.58	14.30	7.38	8.76	5.73	6.14	4.26	4.71	0.99 (0.92–1.08)
α -羟基咪达唑仑	12.22	12.23	7.47	7.47	5.40	8.59	4.07	6.48	0.95 (0.86–1.05)
α -羟基三唑仑	24.22	36.80	13.36	13.36	10.34	10.34	7.19	8.21	1.06 (0.89–1.29)
氯胺酮	4.69	7.63	5.19	5.19	3.62	5.39	4.73	5.27	0.96 (0.91–0.99)
哌替啶	3.94	6.72	4.58	5.14	4.30	5.94	3.98	4.58	0.98 (0.94–1.04)
甲氧麻黄酮	6.50	7.51	4.80	5.12	4.22	4.78	3.88	3.89	0.98 (0.92–1.00)
甲丙氨酯	6.73	8.22	7.13	7.13	4.85	5.79	4.52	5.60	0.97 (0.91–1.01)
美沙酮	3.63	3.88	4.78	5.15	3.63	6.04	3.84	4.65	0.98 (0.93–1.02)
甲沙酮	10.34	14.32	7.62	8.57	6.56	9.22	5.83	7.15	1.05 (0.98–1.24)
甲基酮	5.45	7.26	6.09	6.50	4.61	5.80	4.97	5.00	0.96 (0.91–1.03)
哌醋甲酯	4.20	6.87	4.82	4.95	3.55	5.19	3.64	4.47	1.01 (0.95–1.06)
间羟基苯甲酰芽子碱	10.12	12.82	6.45	6.55	5.16	6.78	4.98	5.62	0.98 (0.90–1.03)
咪达唑仑	6.74	7.32	5.74	5.88	4.85	6.72	3.46	4.52	0.95 (0.83–1.00)
吗啡	8.02	10.33	5.63	5.88	4.07	5.42	5.60	5.82	0.97 (0.90–1.01)
纳洛酮	15.75	20.31	9.64	10.32	8.05	8.93	8.03	8.03	1.04 (0.91–1.24)
6 β -纳曲醇	18.16	18.70	11.08	11.25	6.81	7.51	7.00	8.95	0.94 (0.83–1.07)
纳曲酮	17.21	17.47	10.26	12.10	7.05	8.11	7.38	8.83	1.01 (0.82–1.18)
去甲丁丙诺啡	12.67	13.54	12.80	12.96	6.35	9.14	4.72	6.66	1.03 (0.92–1.26)
去甲地西洋	7.30	8.50	6.57	6.91	4.24	6.21	6.00	6.01	0.92 (0.84–0.97)
去甲芬太尼	7.19	11.32	5.49	5.97	5.02	6.08	4.10	5.19	0.96 (0.88–1.01)
甲氢可酮	10.27	12.08	11.14	11.14	6.28	7.27	5.90	5.90	1.01 (0.93–1.13)
去甲氯胺酮	6.97	9.70	6.76	7.14	4.34	5.90	4.16	5.27	0.98 (0.93–1.07)
去甲哌替啶	4.38	5.59	5.84	5.84	3.86	4.86	3.97	5.00	0.97 (0.93–1.03)
去甲羟考酮	7.71	11.33	10.35	10.35	5.75	8.30	5.93	6.51	1.00 (0.80–1.12)
去甲羟吗啡酮	4.59	5.08	4.27	4.27	3.76	5.92	4.31	4.72	0.72 (0.54–0.89)
羟考酮	5.29	6.83	6.21	8.49	5.07	6.58	5.14	5.73	0.97 (0.91–1.05)
羟吗啡酮	6.87	8.75	4.31	5.08	4.53	6.55	4.36	4.80	1.02 (0.99–1.10)
苯环己哌啶(PCP)	4.47	6.66	4.64	4.75	3.57	5.16	3.65	4.49	0.98 (0.92–1.01)
普瑞巴林	12.28	20.37	8.02	8.37	7.05	7.74	6.58	8.28	0.98 (0.90–1.08)
丙氧芬	4.52	6.13	4.88	4.88	3.79	5.00	4.64	6.16	0.98 (0.93–1.01)
利他林酸	4.08	6.04	4.89	6.62	4.21	6.20	5.08	6.77	0.98 (0.93–1.02)
他喷他多	4.86	6.61	4.90	4.90	4.61	6.19	4.36	4.89	0.97 (0.93–1.00)
曲马多	5.43	5.56	4.38	4.38	4.40	5.59	3.44	3.55	0.93 (0.87–1.02)
曲唑酮	4.21	6.66	4.59	4.59	3.46	6.04	4.30	5.74	0.94 (0.88–1.01)

特色产品

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

Xevo TQ-S micro IVD系统 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/masstrak-acquity-uplc-i-class-plus-xevo-tq-s-micro-ivd-system.html>>

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

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007898ZH, 2023年6月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号