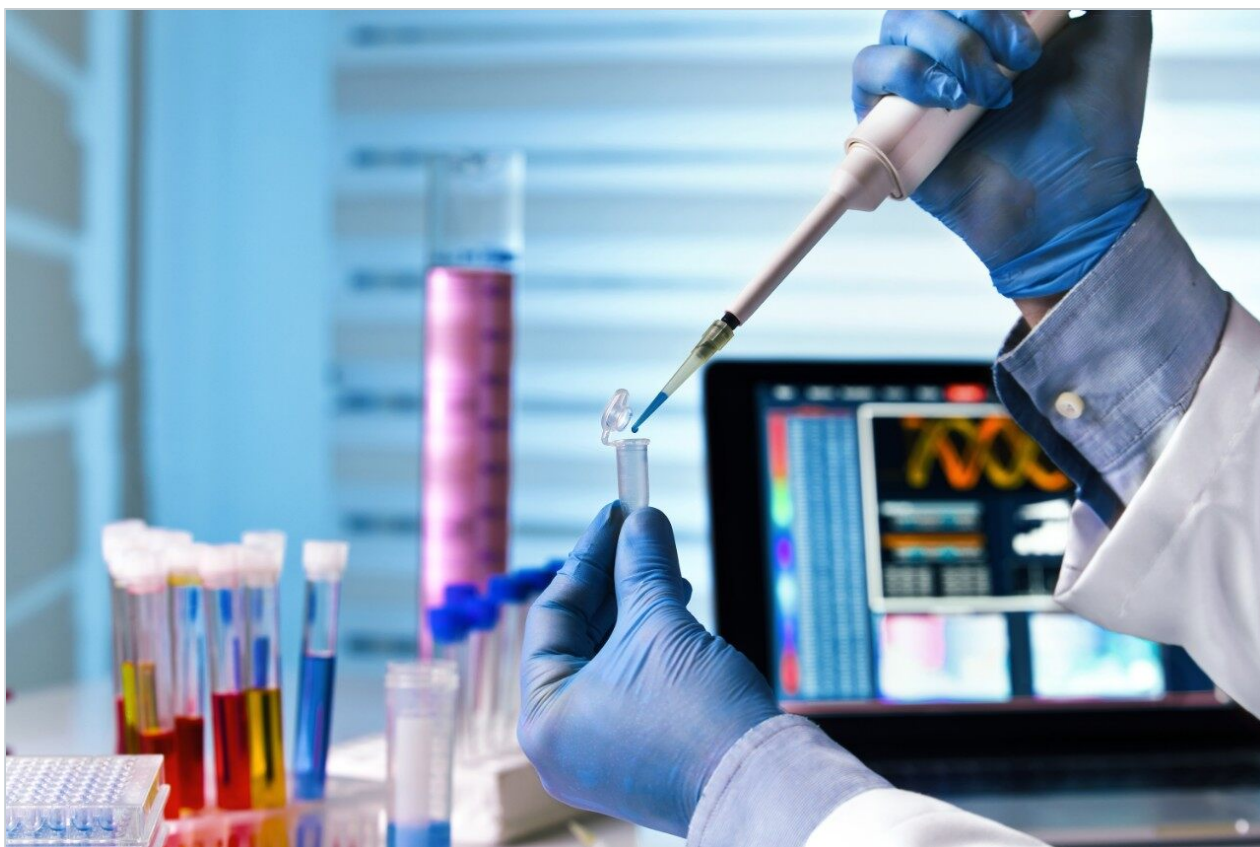


应用纪要

使用Xevo TQD或Xevo TQ-S micro在负离子电喷雾电离模式下进行法医毒理学靶向MRM筛查

Robert Lee, Michelle Wood

Waters Corporation



仅适用于法医毒理学应用。

摘要

本应用简报利用Xevo TQD或Xevo TQ-S micro在MRM模式下检测负电离化合物，评估之前所发表方法的性能。

Xevo TQD和Xevo TQ-S micro质谱仪旨在提供快速、可靠、可重现的数据，从而在宽泛的动态范围内提供始终如一的低水平定量结果。与ACQUITY UPLC I-Class系统联用后，Xevo TQD和Xevo TQ-S micro在使用预配置的靶向MRM定性筛查方法分析尿样中的负电离化合物（如巴比妥类、利尿剂和NSAID）时表现出优异的灵敏度。针对负电离化合物使用专用的色谱条件能够在毒理学相关浓度下检出一些化合物，这是使用标准筛查条件无法实现的。本文所述样品制备方法也可用于其它生物基质，例如血清或血浆。

优势

一种简单灵敏的UPLC-MS/MS方法，用于在法医毒理学实验室中对生物基质中的负电离化合物进行靶向MRM筛查。

简介

法医毒理学实验室需要采用可靠的筛查方法来检出死前和死后样本等高度复杂生物基质中的各种毒物。

2009年，Waters发布了使用ACQUITY TQD系统的靶向毒理学筛查应用¹。该方法已经在许多研究组中得到常规使用，包括Rosano等人使用该方法分析死后血液样品²，Lee使用该方法分析药物中毒患者的尿样³。该方法被配置为在正离子电离(ESI)模式下检测化合物；但对于法医毒理学家而言，仍有一些化合物，如巴比妥类药物、利尿剂和非甾体抗炎药(NSAID)，只能在负离子ESI模式下进行检测或在负ESI模式下灵敏度有所提高。

2015年报道了使用飞行时间质谱仪进行毒理学筛查的负电离方法及相关色谱方法，该方法表明色谱条件对分析性能和灵敏度具有显著影响；75%的检测分析物表现出峰响应增加，增加幅度为2~50倍⁴。在本研究中，将该方法修改为使用沃特世提供的两种串联质谱仪（Xevo TQD和Xevo TQ-S micro），并对负离子ESI模式下的靶向MRM筛查进行评估。

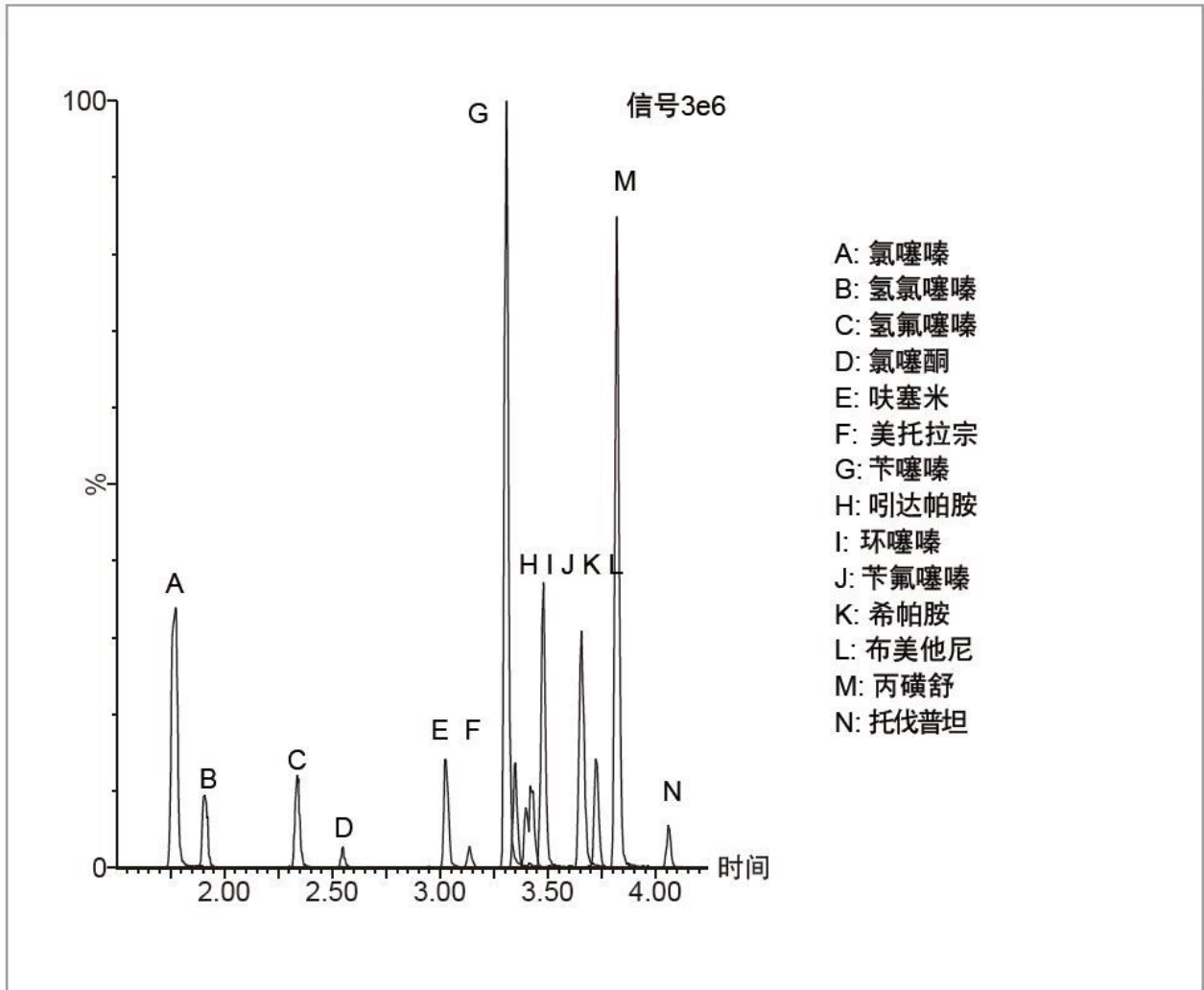


图1.使用提供的样品方法和靶向MRM方法，通过Xevo TQD检测得到的色谱图，显示了按WADA MRPL (200 ng/mL)向对照尿液中加标利尿剂得到的结果。仅显示了定量离子通道。

实验

测试物质

获取以下市售的人尿液参比标准品：购自ACQ Science的DCT-25% (UR22020A)；购自UTAK的尿液毒理学对照品DAU HC2 (50701)；以及购自Bio-Rad的Liquichek尿液毒理学质控样品 - 阴性对照品(460)、C2 (442)和S10 (673)。

制备加标尿液

将53种毒理学相关分析物（包括NSAIDs (17)、利尿剂(16)、巴比妥类(8)、大麻素(3)等）分成8种混合物，每种混合物最多包含8种分析物，使用甲醇制成浓度为10 µg/mL的溶液。将每种混合物加入Bio-Rad阴性对照尿液中，浓度为200 µg/mL，这是世界反兴奋剂机构(WADA)推荐用于尿液分析的最低要求执行限量(MRPL)⁵

样品制备

用200 µL 4%磷酸稀释200 µL各种加标或市售参比尿液，然后涡旋混合。离心后，将200 µL稀释的样品上样到Oasis PRiME HLB µElution提取板（部件号186008052）上。完成上样后，用200 µL 5%甲醇清洗样品孔，并用2 x 25 µL乙腈/甲醇(90/10 v/v)洗脱分析物。使用Techne样品浓缩器在50 °C的氮气流下吹干样品，然后复溶于包含10%乙腈的100 µL 0.001%甲酸中。用经过硅胶/PTFE处理的沃特世隔垫覆盖收集板，涡旋混合2分钟。

LC条件

系统：	配备Flow -Through -Needle (FTN)的ACQUITY UPLC I-Class系统
色谱柱：	ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ , 100 Å, 1.8 µm, 2.1 mm x 150 mm（部件号186003534）
柱温：	50 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	10 µL
清洗溶剂：	乙腈/水(95:5 v/v)
清除溶剂：	0.001%甲酸水溶液
流速：	0.4 mL/min
流动相A：	0.001%甲酸水溶液
流动相B：	含0.001%甲酸的乙腈/水溶液

MS条件

系统：	Xevo TQD或Xevo TQ-S micro
电离模式：	ESI
毛细管电压：	2.5 KV
离子源温度：	150 °C
脱溶剂气温度：	400 °C
脱溶剂气流速：	800 L/h
锥孔气流速：	20 L/h
锥孔电压：	在提供的MRM方法中进行预配置
碰撞能量：	在提供的MRM方法中进行预配置

结果与讨论

使用提供的MRM方法采集数据，该方法中每个化合物包含两个离子通道（定量离子以及可能情况下的定性离子），还包含与53种化合物的锥孔电压和碰撞能量相关的预配置参数。使用TargetLynx应用管理软件自动处理数据，并在两个UPLC-MS/MS平台上比较筛查结果的等效性。

在按200 ng/mL加标尿液的53种化合物中，在两个LC-MS/MS平台上使用上述方法均检出了其中的51种化合物。使用报道的样品制备方法未检出阿米洛利和坎利酸，但如果使用包含10%乙腈的0.001%甲酸将尿液稀释5倍，则可以在该浓度下检测到。

在两套UPLC-MS/MS系统中，使用上述方法分析阴性对照参比尿液和包含认证浓度的分析物的四种阳性对照参比尿液（C2、S10、DAU HC2和DCT -25%）。在两个平台上分析阴性对照参比尿液时，均检出了尿样筛查中通常会观察到的许多化合物，即阿司匹林的代谢物（水杨酸和龙胆酸）以及萘普生（一种常用的NSAID）。对于经过认证的阳性对照参比尿液，在两个平台上均检出了所有预期分析物，包括多种巴比妥酸盐和羧基-

THC（在尿样中发现的四氢大麻酚(THC)的主要代谢物）（图2）。这些分析物的检出浓度与欧洲工作场所药物检测协会(EWDTS)目前推荐的尿液筛查和确认检测的最大截止浓度相当⁶。

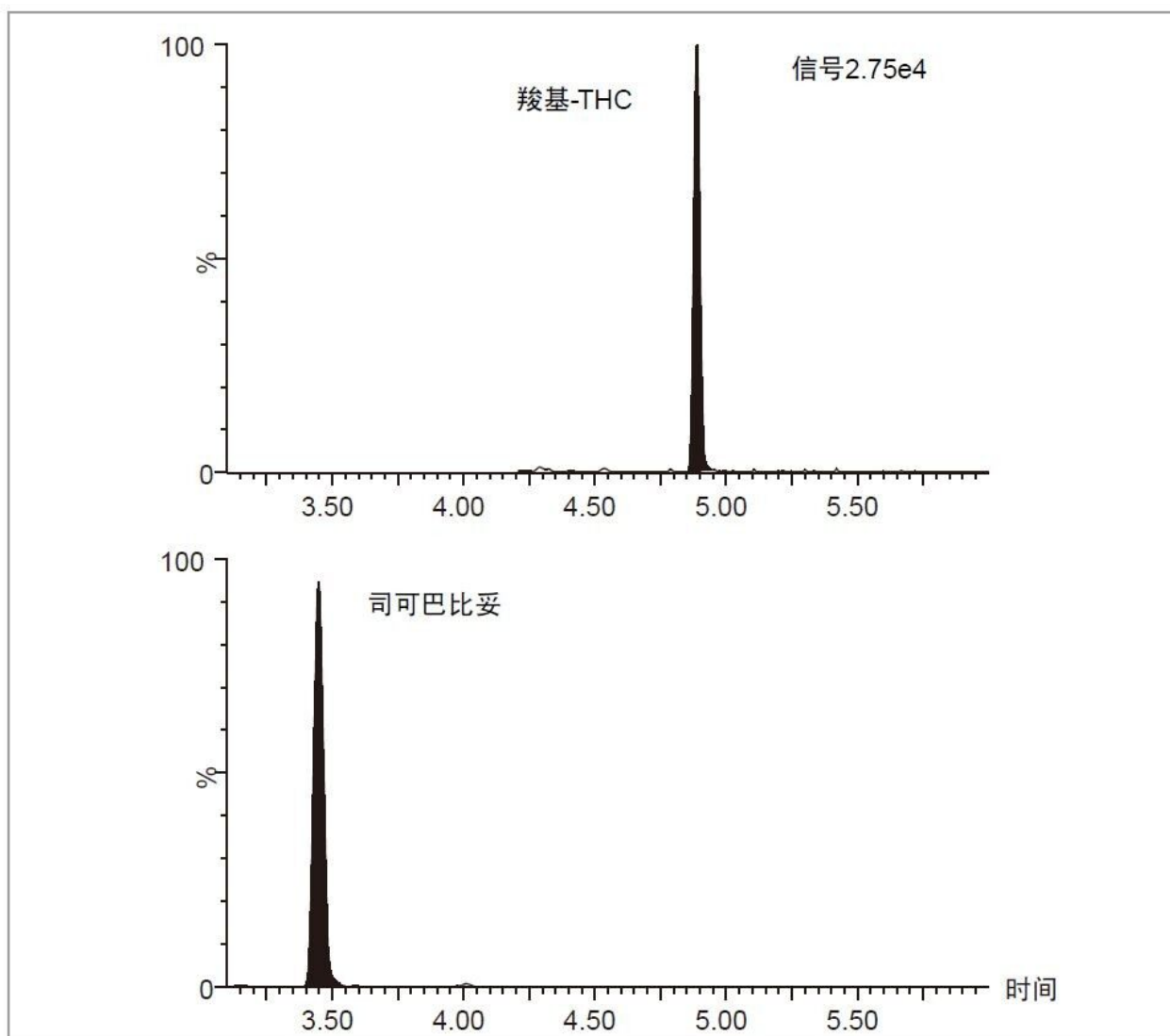


图2.使用提供的样品制备方法和靶向MRM方法，通过Xevo TQD检测得到的色谱图，显示了Bio-Rad S10市售参比尿液中检出的司可巴比妥(150 ng/mL)和羧基-THC (37.5 ng/mL)。仅显示了定量离子通道。

结论

Xevo TQD和Xevo TQ-S micro质谱仪旨在提供快速、可靠、可重现的数据，从而在宽泛的动态范围内提供始

终如一的低水平定量结果。与ACQUITY UPLC I-Class系统联用后，Xevo TQD和Xevo TQ-S micro在使用预配置的靶向MRM定性筛查方法分析尿样中的负电离化合物（如巴比妥类、利尿剂和NSAID）时表现出优异的灵敏度。针对负电离化合物使用专用的色谱条件能够在毒理学相关浓度下检出一些化合物，这是使用标准筛查条件无法实现的。本文所述样品制备方法也可用于其它生物基质，例如血清或血浆。

参考文献

1. Roberts M, Lee R, and Wood M. Targeted MRM Screening for Toxicants in Biological Samples by UPLC/MS/MS. Waters Application Note. 720002749EN. 2009
2. Rosano T, Wood M, and Swift T. Postmortem Drug Screening by Non-Targeted and Targeted Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technology. Journal of Analytical Toxicology. 35: 411-423. 2011.
3. Lee YW. Simultaneous Screening of 177 Drugs of Abuse Using Ultra-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry in Drug-Intoxicated Patients. Clinical Psychopharmacology and Neuroscience. 11(3): 158-164. 2013.
4. Lee R, Freeto S, Wakefield M, and Wood M. No Compromise! Improved Sensitivity for Negatively Ionising Substances. Waters Application Note. 720005479EN. 2015.
5. The World Anti-Doping Code. WADA Technical Document – TD2017MRPL. <https://www.wada-ama.org> (accessed 11 Dec 2018).
6. European Workplace Drug Testing Society Guidelines. <http://www.ewdts.org> (accessed 11 Dec 2018).

特色产品

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

Xevo TQD三重四极杆质谱 <<https://www.waters.com/134608730>>

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

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

可在线购买

ACQUITY UPLC HSS C18色谱柱, 100Å, 1.8 μm, 2.1 mm X 150 mm <

<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186003534>>

Oasis PRiME HLB 96孔μElution板, 每孔装填3 mg吸附剂 <

<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186008052>>

720006512ZH, 2019年2月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.