两全其美：利用回顾性数据挖掘功能检测尿液中 35 种目标药物和代谢物列表的 LC/Q-TOF 方法

应用简报

临床研究

作者

Natalie N. Rasmussen[1]、Julie Cichelli[3]、Carrie Adler[3]、Adam Barker[1,2] 和 Frederick G. Strathmann[1,2]

[1] 美国犹他州盐湖城 ARUP 临床和实验病理学研究所

[2] 美国犹他州盐湖城犹他大学病理学系

[3] 安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA USA

摘要

合规性测试一直是药物检测领域的一个关键组成部分。本研究开发了一种在临床研究中仅通过一次进样即可筛查并确认药物的双重鉴定策略，作为传统免疫筛查和确认的替代方式。我们使用四极杆飞行时间质谱仪 (Q-TOF) 的四极杆功能，结合碎片图谱、精确质量数、保留时间和同位素保真性，以更高的准确性鉴定目标分析物。

Agilent Technologies

前言

高分辨率精确质量数液质联用系统适用于常见滥用药和其他违禁药物的快速分析。本研究开发出了一种用于尿液中 35 种药物和代谢物的高灵敏度、高特异性定性测定方法。使用安捷伦 LC/Q-TOF 系统在目标化合物的相应截止浓度下检测并确认目标化合物。将 Agilent 6550 LC/Q-TOF 和 Agilent 1290 Infinity UHPLC 堆栈联用，可在 3.3 分钟内快速分析目标分析物。此方法专为分析尿液中的常规滥用药开发，通过该方法在单次运行中即可筛查并确认目标化合物，另外回顾性审查扫描数据还能用于未来确定可能的未知化合物。

化合物鉴定依赖于精确质量数、保留时间、同位素间隔和丰度、MS/MS 谱库匹配以及总得分。MassHunter 定性分析软件使用谱峰识别算法生成总得分，其依据是所观察鉴定标准与理论值和经验值的对应方式。根据此前发表的方法[1] 指定的相应药物截止浓度绘制原点的单点校准曲线，从而进行化合物的半定量分析。

内标

- 6am-d6
- α-羟基阿普唑仑-d5
- 地西泮-d5
- 哌替啶-d4
- 甲基苯丙胺-d5
- 吗啡-d3
- 去甲芬太尼-d5

实验部分

液相色谱配置和参数

配置	
Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)	
Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)	
Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)	
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm 液相色谱柱 (699775-902)
柱温	60 °C
进样量	2 µL
流动相 A	5 mM 甲酸铵水溶液，pH 3.5
流动相 B	Optima 级甲醇
流速	1 mL/min
梯度	时间 (min) %B 0.0 10 0.5 10 3.0 95 3.3 95

Q-TOF 质谱仪配置和参数

配置	
Agilent 6550 四极杆飞行时间质谱仪	
电喷雾模式，正离子模式	
AutoMSMS 模式，使用优选列表	
干燥气温度	250 °C
干燥气流速	15 L/min
雾化器压力	30 psi
鞘气温度	400 °C
鞘气流速	12 L/min
喷嘴电压	0 V
毛细管电压	3500 V
碎裂电压	125 V
锥孔电压	65 V
八极杆 RF	750 V
质量数范围	MS 100-1000 *m/z* MS/MS 50-500 *m/z*
采集速率	MS：8 幅谱图/秒；MS/MS：4 幅谱图/秒
碰撞能量	10、20、40 V
检测器采集速率	扩展的动态范围，高灵敏度限幅器位置

化学品与试剂

所有药物、代谢化合物以及氘代内标均购自 Cerilliant 公司 (Round Rock, Texas)。甲醇购自赛默飞世尔科技公司 (Waltham, MA)，β-葡萄糖醛酸酶购自 IMCS (Columbia, SC)。

样品前处理

根据如下步骤配制样品、单点校准品和 QC 基质溶液。首先，向收集板添加 200 µL 样品。然后添加 180 µL 含 7 种氘代标记物的碳酸氢钠缓冲液、34 µL 试卤灵葡糖苷酸溶液、16 µL β-葡萄糖醛酸酶，与样品轻轻混合。之后在室温下温育 15 分钟，将 300 µL 样品混合物转移至 Biotage Isolute SLE+ 96 孔板 (Charlotte, NC, USA)，用于进一步纯化。施加正压使样品吸收，持续 5 分钟。用 0.8 mL 乙酸乙酯洗脱样品，氮气下吹干，然后使用 90:10 A、B 流动相混合物进行重悬。

数据分析

利用 Agilent MassHunter 四极杆飞行时间采集软件 (B.06) 和定性分析 (B.07 SP2) 软件进行系统控制和数据采集。并用分子式查找算法和谱库搜索软件功能分析数据。可接受标准中包括与以下参数的匹配：保留时间（0.015 分钟内）、同位素间隔和丰度、精确质量数（5 ppm 以内）以及 MS/MS 谱库匹配和总得分 (> 85)。

药物和代谢物截止浓度 (ng/mL)

化合物	截止限
6-单乙酰吗啡	10
7-氨基氯硝西泮	40
α-羟基阿普唑仑	20
阿普唑仑	40
安非他明	100
丁丙诺啡	5
氯硝西泮	20
可待因	40
地西泮	50
芬太尼	2
氢可酮	40
氢吗啡酮	40
劳拉西泮	60
MDA（3,4-亚甲二氧基安非他明）	200
MDEA（3,4-亚甲二氧基-N-乙基安非他明）	200
MDMA（亚甲二氧基甲基苯丙胺）	200
甲基苯丙胺	400
咪达唑仑	20
吗啡	20
去甲丁丙诺啡	20
去甲西泮	50
去甲芬太尼	2
去甲氢可酮	100
去甲哌替啶	50
去甲羟考酮	100
去甲氧吗啡酮	100
奥沙西泮	50
羟考酮	40
氧吗啡酮	40
芬特明	100
利他林酸	100
他喷他多	100
他喷他多-O-硫酸盐	200
替马西泮	50
唑吡坦	20

结果与讨论

之前用 Agilent 6230 飞行时间质谱仪 (TOF) 分析过的去鉴定化样品 (n = 160)，采用 LC/Q-TOF 进行再分析。通过添加含内标混合物的碳酸氢钠缓冲液、试卤灵葡糖苷酸和 β-葡萄糖醛酸酶配制样品。试卤灵葡糖苷酸起控制水解反应的作用。经短暂温育后，将样品混合物转移至支持的液相萃取板，用于进一步纯化。用乙酸乙酯洗脱样品，氮气下吹干，然后使用流动相进行重悬。使用 LC/Q-TOF 系统和反相 C18 色谱柱分析样品。对化合物截止浓度处的单点校准品和质量控制 (QC) 样品进行分析。

Agilent 6550 Q-TOF 和 6230 TOF 结果在 160 个样品数据集内具有出色的相关性。由于 6550 Q-TOF 仪器的分析灵敏度较高，因此可鉴定出更多的差异，例如找到更多代谢物。在四种情况下，使用 6550 Q-TOF 系统检测出了之前未报告的唑吡坦和 7-氨基氯硝西泮。这些样品的浓度低于 6230 TOF 分析方法中指定的截止浓度。

经五次数据集分析之后，6550 Q-TOF 系统根据已知药物代谢物母体鉴定出了高丰度药物。或通过稀释这些样品对母体药物进行确认性鉴定。

在原始的 160 个样品数据集中，有 9 种样品需要使用液相色谱/三重四极杆质谱仪 (LC/MS/MS) 系统进行进一步确认。这 9 种样品的药物代谢模式不常见或质量指标不是最佳，需通过 6230 TOF 分析方法进行验证是否合格。相比之下，使用 6550 Q-TOF 可对这 9 种样品所含的所有分析物进行鉴定并获得匹配的碎片图谱，无需进行额外的测试。

结论

上述 LC/Q-TOF 方法具有较高的特异性和分析灵敏度，能提供快速且准确的分析物鉴定方式。该方法具有碎片图谱和谱库匹配功能，无需用 LC/MS/MS 法确认非最佳结果。该方法利用 TOF 的离子传输功能，片段的高质量准确度检测特异性有所加强，因此比传统 LC/TOF 和 LC/MS/MS 方法特异性更高。该方法还可用于目标分析物筛查，另外同时收集 TOF 数据的功能提供了回顾性数据分析的机制。

参考文献

1. McMillin, G. A.; *et al.* A hybrid approach to urine drug testing using high-resolution mass spectrometry and select immunoassays. *Am. J. Clin. Pathol*. **2015 Feb**; *143(2)*, 234-40

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017

2017 年 3 月 28 日，中国出版
5991-7955CHCN

Agilent Technologies