

使用 Agilent Chem Elut S 固相支持液液萃取进行人体尿液中滥用药物的 LC/MS/MS 分析

作者

Derick Lucas
安捷伦科技有限公司

摘要

Agilent Chem Elut S 是一款使用合成吸附剂进行固相支持液液萃取 (SLE) 的全新样品前处理产品。本应用简报介绍了采用 Chem Elut S 96 孔板 (400 mg) 对人体尿液中的 24 种滥用药物 (DOA) 进行 LC/MS/MS 定量分析。使用 β -葡萄糖醛酸酶对尿液样品进行酶解，然后加载到 Chem Elut S 400 mg 96 孔板上。将水相样品吸附到填料中并平衡 5 分钟，然后用甲基叔丁基醚 (MTBE) 洗脱得到含目标分析物的洁净萃取物。对该方法的准确度和精度进行验证，除一种化合物外，其余化合物均得到了出色的回收率 ($100\% \pm 20\%$) 和精度 (%RSD < 20%)。与传统的液液萃取 (LLE) 法和硅藻土 SLE 法相比，该法具有明显优势。结果表明，基于合成 SLE 吸附剂的 Chem Elut S 为本应用提供了快速、简单而一致的样品前处理。

前言

在法医毒理学中，生物样本中 DOA 的快速、可靠定量在法医学检测领域引起了极大关注^[1-3]，主要原因是 DOA 和提交分析的样品数量日益增多。DOA 尿液检测是用于人体中 DOA 筛查和定量最常见的法医学检测手段之一。尿液基质没有其他生物基质（如血浆和血清）那么复杂。而其中含有大量不同的盐类，会对检测可靠性和仪器可用性造成影响。因此，基质净化和 DOA 萃取前需要进行适当的样品前处理。此外，对于以下萃取和分析，在样品前处理之前，通常需要对 DOA 分析物进行糖基化并使用 β -葡萄糖醛酸酶进行酶解，以释放游离药物^[4]。

常用的 DOA 分析样品前处理技术包括 LLE、固相萃取 (SPE) 和 SLE。LLE 步骤较为繁琐，需要大量的样品混合、手动相分离，以及不定时的离心来破坏乳浊液。此外，LLE 与 SLE 相比因过程繁琐难以实现自动化。在传统的 SLE 中，将水相样品加载到含硅藻土 (DE) 的吸附剂柱床，其中的水相样品以薄膜形式涂覆在材料上。然后让与水不混溶的溶剂通过 SLE 柱床，从样品中提取出目标分析物，并将

其洗脱至收集管用于后续处理和分析。与传统 LLE 相比，使用 SLE 时水相和有机相表面之间的相互作用明显增强，从而改善了从水相到有机相的分析物分配，成功替代了混合步骤。与传统 LLE 相比，SLE 节省了大量的时间和人力，并简化了操作，提高了重现性。

此外，DE 是一种由不规则石化微生物组成的天然材料，难以控制吸附剂颗粒批次间的一致性。吸附剂的多样性使产品生产和质量控制复杂化，并导致产品性能的不一致。与合成填料相比，DE 的持水量更低且各不一致。Chem Elut S 吸附剂极大提高了持水量，改善了批间一致性和性能一致性。96 孔板的设计为样品和洗脱液提供了较大的顶空，在施加压力/真空前，上方的方形筛板可以放置样品，设计的全裙板可实现硬件兼容性以及快速、一致的洗脱。

本研究采用 Chem Elut S 2 mL 96 孔板 (400 μ L) 定量测定人体尿液中的 24 种 DOA。并根据回收率、重现性和易用性，对 Chem Elut S、LLE 和基于 DE 的 SLE 进行了实验比较评估。

实验部分

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。甲醇 (MeOH) 和乙腈 (ACN) 购自 Honeywell (Muskegon, MI, USA)，甲基叔丁基醚 (MTBE) 购自 VWR-BDH Chemicals (Radnor, PA, USA)。浓盐酸溶液 (HCl, 38%) 购自 VWR。混合 DOA 标准储备液来自安捷伦科技公司 (部件号 5190-0470)，内标 (IS) 储备液 (1 mg/mL) 来自 Cerilliant (Round Rock, TX, USA)。 β -葡萄糖醛酸酶为溶液形式 (100000 单位/mL)，购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。人体尿液 (Mass Spect Gold) 购自 Golden West Biologicals, Inc. (Temecula, CA, USA)。每批次使用前配制新鲜试剂溶液，避免浓度变化。

标样和溶液

用适当体积的单独储备液在甲醇中稀释配制混合标样和 IS 中间加标溶液，浓度为 20 μ g/mL。所有加标溶液在使用前均于 -20 °C 下储存。

设备和备件

- Agilent Chem Elut S 400 μ L (部件号 5610-2004)
- 安捷伦正压多孔处理装置，PPM-96 (部件号 5191-4116)
- 安捷伦方形 96 孔 2 mL 收集板 (部件号 5133009)
- 安捷伦方形 96 孔密封盖 (部件号 5133005)
- SPE 96 蒸发器
- 多管涡旋仪 (VWR, PA, USA)
- Eppendorf 移液管和重复用移液器
- ViaFlo 96 液体处理器 (Integra, Hudson, NH, USA)

仪器条件

- Agilent 1290 Infinity 四元泵 (G4204A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 恒温器 (G1330B)

表 1 列出了分析物采集参数，图 1 显示了尿液中 1 ng/mL DOA 的 LC/MS/MS 色谱图。按照洗脱顺序的峰归属如表 1 所示。

液相色谱参数	
分析柱	Agilent Poroshell 120 EC-C8, 2.7 μ m, 2.1 \times 100 mm (695775-906T) Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 \times 5 mm, 2.7 μ m, 保护柱 (821725-911)
柱温	50 °C
进样量	2 μ L
流动相 A	5 mmol/L 甲酸铵 + 0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	0.1% 甲酸的乙腈溶液
流速	0.5 mL/min
梯度	5% B 保持 0.5 min 升至 50% B (保持 5 min) 升至 95% B (保持 6 min) 95% B 保持 7 min
后运行时间	2 min

MS/MS 配置和参数

采用 iFunnel 的 Agilent 6490 三重四极杆 LC/MS (G6490A)	
MS/MS 模式	动态 MRM
离子模式	正离子
干燥气温度	250 °C
干燥气流速	5 L/min
雾化器压力	45 psi
鞘气温度	325 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3000 V
EMV	200 V
喷嘴电压	1500 V
iFunnel 参数	高压 RF: 90 (正离子), 90 (负离子) 低压 RF: 70 (正离子), 60 (负离子)

表 1. 目标药物、保留时间和 MRM 参数

分析物	内标	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)			
				定量离子	CE (V)	定性离子	CE (V)
可待因	IS 1	2.35	300.2	128.1	60	165.1	40
羟考酮	IS 1	2.68	316.2	241.1	28	256.1	24
安非他明	IS 1	2.64	136.1	93.0	13	124.1	5
安非他明-d ₃ (IS 1)		2.64	141.1	91.1	20	119.1	10
MDA	IS 1	2.72	180.1	163.1	4	105.1	24
氢可酮	IS 1	2.84	300.2	128.1	60	199.1	28
甲基苯丙胺	IS 1	2.87	150.1	91.1	20	119.1	8
MDMA	IS 1	2.91	194.1	163.1	8	105.1	24
士的宁	IS 1	3.10	335.2	184.1	40	156.1	40
芬特明	IS 1	3.10	150.1	133.1	8	133.1	8
MDEA	IS 1	3.19	208.1	163.1	8	105.1	48
海洛因	IS 2	3.81	370.2	328.2	20	165.1	24
可卡因	IS 2	3.94	304.2	182.1	16	82.0	40
可卡因-d ₃ (IS 2)		3.94	307.2	185.1	30	82.0	48
哌替啶	IS 2	4.03	248.2	220.1	20	174.1	48
曲唑酮	IS 2	4.35	372.2	176.1	24	148.1	16
PCP	IS 2	4.51	244.2	159.1	8	159.1	8
硝西洋	IS 2	5.20	282.1	180.1	40	236.1	24
奥沙西洋	IS 2	5.27	287.1	241.1	20	104.1	40
维拉帕米	IS 2	5.44	455.3	165.1	28	150.1	48
劳拉西洋	IS 3	5.41	321.0	229.1	32	275.0	20
阿普唑仑	IS 3	5.51	309.1	205.1	48	281.1	40
美沙酮	IS 3	5.54	310.2	265.2	12	105.0	28
替马西洋	IS 3	5.73	301.1	177.0	44	255.1	16
普罗地芬	IS 3	6.24	354.2	167.1	40	209.1	20
地西洋	IS 3	6.18	285.1	193.1	32	154.1	24
地西洋-d ₃ (IS 3)		6.18	290.1	198.1	32	154.1	24

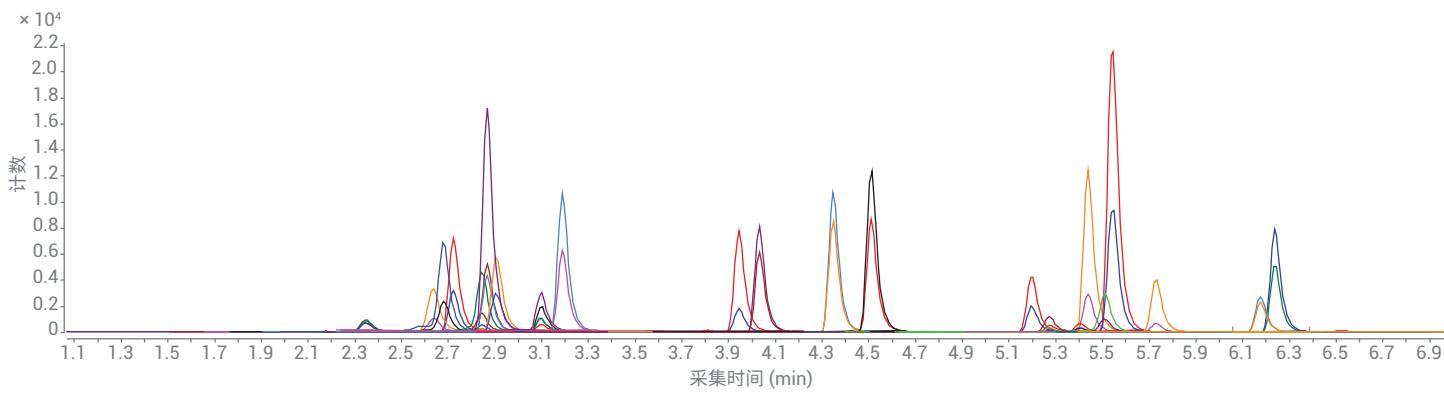


图 1. 尿液中 24 种药物 (1 ng/mL) 经 Agilent Chem Elut S 处理后的 LC/MS/MS MRM 叠加色谱图

校准标样和 QC 样品前处理

使用人体尿液的 DOA 标样加标溶液 (1 μ g/mL) 制备校准曲线标样。校准曲线的动态范围为 0.1–20 ng/mL, 包括 0.1、0.5、1、5、10、15、20 ng/mL 标样。在流动相 A:ACN (85:15) 中制备纯校准标样溶液, 然后用其复溶基质空白, 生成与基质相匹配的校准曲线。在萃取之前, 向尿液中加标三个浓度的质量控制 (QC) 样品, 包括 0.1 ng/mL 定量限 (LOQ) (安非他明和海洛因例外, LOQ 为 0.5 ng/mL)、1 ng/mL 中等浓度 QC 和 20 ng/mL 高浓度 QC, 然后进行萃取并运行方法回收率和精度的验证。将内标以 200 ng/mL 的浓度加标至 QC 样品、校准品和空白中。

样品前处理过程

基于 SLE 通用方案的样品前处理过程如图 2 所示。四个步骤包括:

1. 缓慢施加正压/真空, 加载水相样品
2. 用 Chem Elut S 吸附剂平衡样品 5 分钟
3. 加入与水不混溶的溶剂/混合溶剂萃取分析物
4. 在重力作用下洗脱有机溶剂, 然后施加正压/真空排空孔板

在样品萃取之前, 用 β -葡萄糖醛酸酶预处理水解尿液样品, 使药物充分去糖基化。筛选出几种与水不混溶的溶剂, 包括 MTBE、乙酸乙酯 (EA) 和二氯甲烷 (DCM); 选择 MTBE 是由于它具有更出色的回收率和重现性。

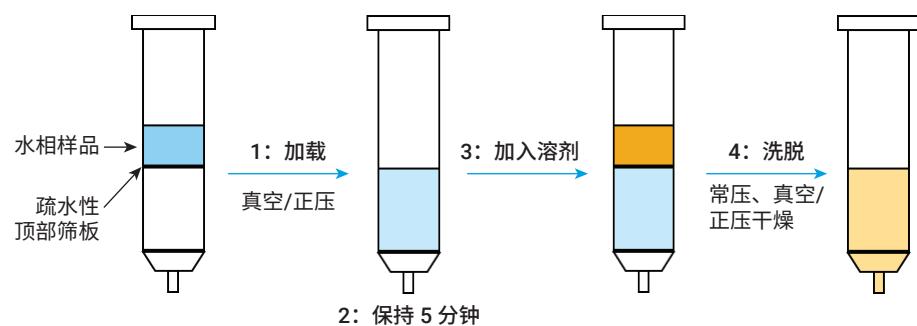


图 2. Agilent Chem Elut S 通用工作流程图

酶水解

1. 将 200 μ L 尿液样品置于 2 mL 收集板, 加入 175 μ L 100 mmol/L 乙酸铵 (pH 4) 和 25 μ L β -葡萄糖醛酸酶溶液 (100000 单位/mL)
2. 涡旋混合 30 秒, 在 40 °C (水浴) 下温育 60 分钟
3. 将样品置于室温下, 加入 20 μ L 5 mol/L 氢氧化铵, 涡旋使酶反应猝灭

SLE 萃取流程

1. 使用 96 位探针式液体处理器将整个样品从收集板转移至 Chem Elut S 400 μ L, 下方放置另一板个 2 mL 收集板。施加 2–3 psi 的压力迫使水相样品进入吸附剂中, 直至孔中无可见液体
2. 平衡 5 分钟
3. 向孔中加入 900 μ L 有机溶剂, 然后使溶剂在重力作用下洗脱。再次加入 900 μ L 有机溶剂进行洗脱 (共 1800 μ L)
4. 施加 3–5 psi 的压力并保持 20–30 秒, 使 SLE 柱床完全干燥

蒸发和复溶

1. 向每个孔中加入 10 μ L 的 10% HCl 溶液。本步骤为选择性步骤, 仅适用于重现性超出可接受范围的挥发性药物, 例如安非他明
2. 将收集板置于 96 孔蒸发器中, 在 40 °C 下用氮气吹干
3. 酌情使用 200 μ L 复溶溶液 (85:15 流动相 A/ACN) 或纯校准标样溶液将其复溶
4. 盖上顶板盖, 涡旋、超声、离心后置于自动进样器进行 LC/MS/MS 分析

方法验证

测试 Chem Elut S 方法分析尿液中 DOA 的回收率和重现性。批次中包括 2 个双空白、8 个空白、两组 7 个校准品, 以及每种浓度 6 个 QC, 其中两组校准曲线中 QC 样品含量相等。在萃取之前, 将同位素内标安非他明-d₃、可卡因-d₃ 和地西泮-d₅ 以 200 ng/mL 的浓度加标至尿液中。

结果与讨论

线性

使用 Agilent Mass Hunter 定量分析软件处理数据。使用线性回归拟合和 $1/x^2$ 加权得到所有目标药物的校准曲线，其 R^2 值均在 0.991–0.999 之间。

回收率与重现性

本研究获得了良好的结果，结果汇总如表 2 所示。除普罗地芬以外，其余所有分析物的回收率为 79.3%–117.4%， $RSD < 16\%$ 。普罗地芬的回收率始终较低 (SLE 和 LLE 方法的回收率均约为 55%，

但有良好的灵敏度和较高的重现性 ($RSD 6.2\%–11.2\%$)。除安非他明和海洛因出于基质干扰或方法灵敏度的原因 LOQ 为 0.5 ng/mL 外，其余化合物的 LOQ 均为 0.1 ng/mL。

表 2. 使用优化的 Chem Elut S 程序测定尿液中滥用药物的实验参数和结果

分析物	LOQ (ng/mL)	校准范围 (ng/mL)	相关系数 (R^2)	平均 ME (% n = 6)	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 % (n = 6)	%RSD (n = 6)
可待因	0.1	0.1–20	0.9973	0	0.1	84.8	12.5
					1	103.4	7.1
					20	93.3	9.7
羟考酮	0.1	0.1–20	0.9915	-8	0.1	91.3	4.3
					1	95.3	2.7
					20	92.4	1.3
安非他明	0.5	0.5–20	0.9932	-3	0.5	103.1	4.0
					1	106.6	3.9
					20	98.9	5.6
MDA	0.1	0.1–20	0.9946	-7	0.1	89.6	5.5
					1	107.5	4.0
					20	96.5	4.8
氢可酮	0.1	0.1–20	0.9981	-14	0.1	112.1	4.0
					1	104.7	8.7
					20	98.3	3.6
甲基苯丙胺	0.1	0.1–20	0.9977	-4	0.1	102.2	7.0
					1	105.3	3.8
					20	103.3	3.9
MDMA	0.1	0.1–20	0.9979	-4	0.1	83.5	6.7
					1	89.2	2.7
					20	88.4	7.6
士的宁	0.1	0.1–20	0.9966	-8	0.1	91.1	15.7
					1	90.8	4.7
					20	90.1	3.0
芬特明	0.1	0.1–20	0.9942	-1	0.1	89.6	8.6
					1	112.8	3.9
					20	101.7	5.4
MDEA	0.1	0.1–20	0.9991	-11	0.1	98.8	4.4
					1	99.9	6.2
					20	98.9	5.2
海洛因	0.5	0.5–20	0.9909	-9	0.5	84.5	6.3
					1	79.3	7.6
					20	86.8	4.1

分析物	LOQ (ng/mL)	校准范围 (ng/mL)	相关系数 (R^2)	平均 ME (% n = 6)	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 % (n = 6)	%RSD (n = 6)
可卡因	0.1	0.1-20	0.9925	-2	0.1	93.0	7.5
					1	98.5	10.3
					20	97.6	9.7
哌替啶	0.1	0.1-20	0.9982	-5	0.1	113.1	2.6
					1	117.2	8.9
					20	107.3	7.1
曲唑酮	0.1	0.1-20	0.9981	-4	0.1	109.2	6.6
					1	109.9	11.4
					20	107.3	4.8
PCP	0.1	0.1-20	0.9944	-15	0.1	102.6	4.2
					1	101.2	11.8
					20	96.6	3.1
硝西洋	0.1	0.1-20	0.9957	9	0.1	99.7	6.9
					1	109.5	14.9
					20	107.9	9.1
奥沙西洋	0.1	0.1-20	0.9914	-9	0.1	116.4	12.0
					1	105.0	15.6
					20	86.8	9.6
维拉帕米	0.1	0.1-20	0.9968	-6	0.1	93.2	6.1
					1	86.7	9.7
					20	88.9	6.6
劳拉西洋	0.1	0.1-20	0.9920	0	0.1	105.3	9.0
					1	106.8	8.5
					20	97.6	11.2
阿普唑仑	0.1	0.1-20	0.9985	-7	0.1	117.2	9.6
					1	111.1	9.3
					20	105.8	5.1
美沙酮	0.1	0.1-20	0.9957	-6	0.1	102.3	5.7
					1	98.3	8.9
					20	97.3	6.5
替马西洋	0.1	0.1-20	0.9976	-8	0.1	117.4	8.1
					1	112.4	10.9
					20	93.5	9.8
普罗地芬	0.1	0.1-20	0.9983	0	0.1	57.9	6.9
					1	52.8	11.2
					20	59.1	6.2
地西洋	0.1	0.1-20	0.9969	1	0.1	94.3	5.7
					1	118.7	10.9
					20	111.3	5.7

方法和产品比较

针对分析物回收率和重现性，还将 Chem Elut S 与 LLE 和竞争厂商基于 DE 的 SLE 进行了比较（图 3）。比较预加标和后加标 QC 样品（尿液中 1 ng/mL）的分析物峰面积，对分析物回收率进行研究。将预加标的 QC 样品适当地加入空白尿样中，并利用开发的 SLE 方法对样品进行前处理。萃取后与 1 ng/mL 标样混合复溶于基质空白，对后加标 QC 样品进行前处理。

利用基于 DE 的 SLE 和 Chem Elut S 执行同样的步骤。LLE 使用相同的预处理、样品和溶剂体积，但需要使用巴斯德吸管手动转移 MTBE 分离相。因此，LLE 比 SLE 多耗时 50% 以上，需要更多人力和时间。

除普罗地芬外，Chem Elut S 为其余所有药物提供了出色的回收率和精度，与预期相同。竞争厂商基于 DE 的 SLE 为大多数分析物提供了可接受的回收率，但几种化合物的回收率明显较低。基于 DE 的 SLE 重现性尤其差，六种化合物六次平行测定的 RSD 超过 20%。不一致的 DE 吸附剂持水量导致孔间样品穿透率不同，从而导致样品前处理过程中的样品不一致。除羟考酮和氢可酮的回收率远低于 SLE 方法外，LLE 方法对其他分析物的回收率与 SLE 方法的回收率相当。相较之下，Chem Elut S 可实现比 LLE 和竞争厂商基于 DE 的 SLE 更出色的回收率和精度。其他生物基质（如血浆）也得到了相同的结果，这些内容将在单独的应用中重点讨论^[5]。

使用 Chem Elut S 进行样品前处理

Chem Elut S 板简单易用，可实现快速、高分析物回收率和高精度的 DOA 分析。合成填料经严格制造，可提供高持样量、一致的填充和最佳流速。优化用于 SLE 的 Chem Elut S 板包括洁净填料、大顶空体积、全裙板，以及在施加正压/真空中可使水相样品放置 60 分钟或更长时间的顶部方形筛板。这些特点可实现出色的数据质量、简单易用，以及有效的基质去除（即盐和部分磷脂），尤其适用于血浆和血清等生物样品^[5]。

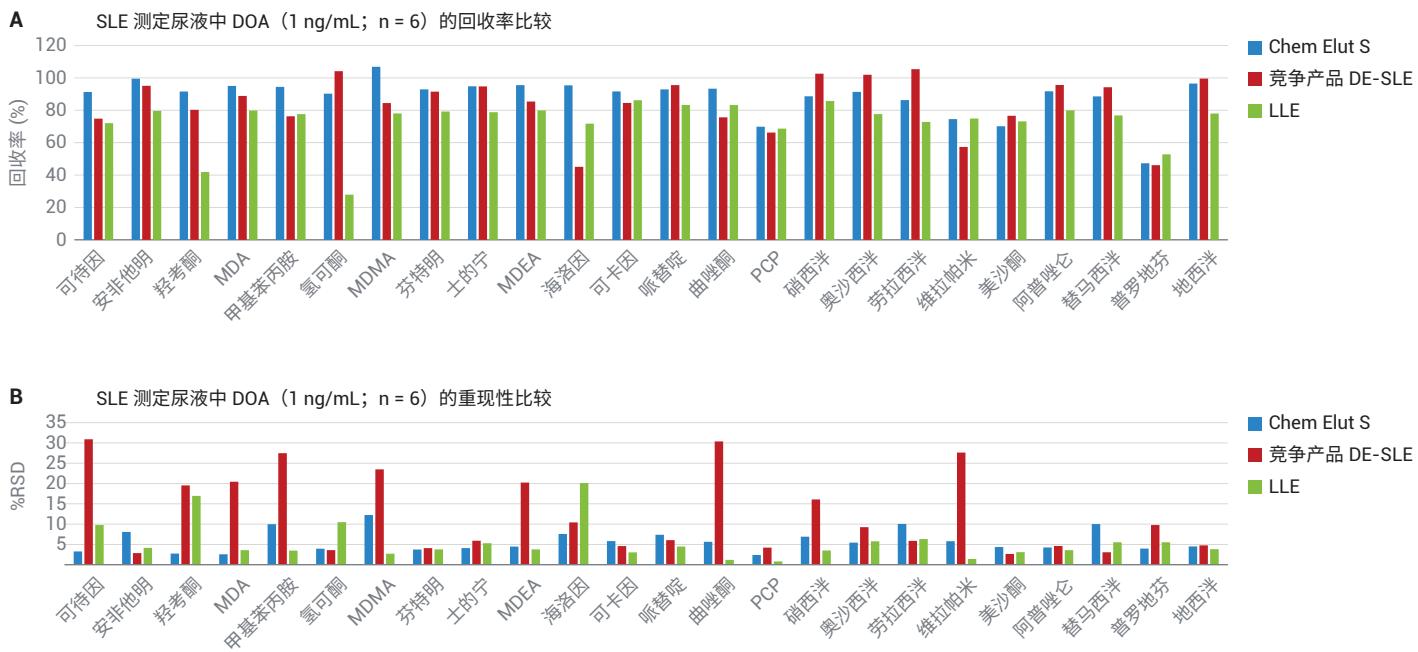


图 3. Agilent Chem Elut S、硅藻土 SLE 和 LLE 测定尿液中 DOA 的回收率和重现性比较

结论

Agilent Chem Elut S 使用合成 SLE 填料，具有一致性和高持水量，与基于 DE 的 SLE 产品相比，可实现更出色的回收率和重现性。使用 Chem Elut S 400 μL 板开发的方法可实现尿液中 DOA 分析出色的回收率和重现性，使用简化的平台可实现快速、一致的高通量分析，获得高质量的结果，同时免除了 LLE 可能产生的麻烦。多种其他样品和分析物类型均获益于 Chem Elut S，具体将在以后的出版物中讨论。

参考文献

1. Eskridge, K. D.; Guthrie, S. K. Clinical Issues Associated with Urine Testing of Substances of Abuse. *Pharmacotherapy* **1997**, *17*(3), 497–510
2. Tang, M. H.; et al. Simultaneous Detection of 93 Conventional and Emerging Drugs of Abuse and Their Metabolites in Urine by UHPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analytl. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, *969*, 272–284
3. Rositano, J.; et al. Supported Liquid Extraction (SLE) for the Analysis of Methylamphetamine, Methylenedioxymethylamphetamine and Delta-9-Tetrahydrocannabinol in Oral Fluid and Blood of Drivers. *Forensic Sci. Int.* **2016**, *265*, 125–130
4. Rosano, T. G.; Ohouo, P. Y.; Wood, M. Screening with Quantification for 64 Drugs and Metabolites in Human Urine using UPLC-MS-MS Analysis and a Threshold Accurate Calibration. *J. Anal. Toxicol.* **2017**, *41*(6), 536–546
5. Zhao, L. 使用安捷伦固相支持液液萃取 (SLE) Chem Elut S 板对人血清中的一组内源性类固醇进行 LC/MS/MS 定量测定，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-0949ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

用于司法鉴定。

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, 2019
2019年5月15日, 中国出版
5994-0950ZHCN

