

# 使用 Agilent RapidFire 365 高通量质谱系统通过 Q-TOF 超快速筛查目标药物的可行性

## 作者

Brandon Nelson 和  
Frederick Strathmann  
NMS Labs  
Willow Grove, PA USA

## 摘要

利用 Agilent RapidFire 365 高通量质谱系统和 Agilent 6545 LC/Q-TOF (RF/Q-TOF) 开发出一种高效定性方法，用于同时分析当前通过 ELISA 进行筛查的一部分分析物。该方法在 RF 进样和 Q-TOF 自动 MS/MS 数据采集之前使用支持液液萃取 (SLE)。个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 提供了评分标准，可将获得的谱图与各种碰撞能量 (CE) 下已知的高质量谱图进行比较，来确认是否存在目标分析物。对该方法与我们实验室中目前使用的 263 种分析物的尸检血液筛查方法进行比较，该筛查方法使用液液萃取 (LLE)，然后进行 10 分钟的 LC/TOF 分析。平均每次进样所需的 RF/Q-TOF 数据采集时间为 10 秒，说明有可能将当前的筛查时间缩短至 1/60。与仅采用 TOF 的精确质量数和保留时间数据相比，使用 Q-TOF 采集能与质谱数据库匹配的高分辨率精确质量数据，也提高了阳性鉴定的可信度。

## 前言

我们的实验室目前所用的尸检血液筛查方法包括使用液液萃取，然后进行 LC/TOF 分析。此类分析方法的一个缺点是，色谱分析需要花费时间来分离基质组分并分离目标同位异位分析物。同样，人尸检全血中存在的同位异位干扰物质也可能导致假阳性，在执行确认测试时可能浪费更多的时间和仪器容量。此外，由于该方法对于修饰非常敏感，因此验证作为潜在筛查目标物的新型目标分析物时可能很繁琐。

Agilent RapidFire 能够超快速地同时分析各种分析物，平均进样时间短于 15 秒。与 6545 Q-TOF 结合使用时，可以快速生成与谱库匹配的谱图数据。可以建立评分标准以筛查提取样品中的目标药物，从而轻松区分真实阳性样品和假阳性样品。

利用目前通过 ELISA 进行筛查的一部分分析物（表 1），来证明在血液高通量筛查中应用 RF/Q-TOF 分析的想法。在进样至 RF/Q-TOF 之前，使用 SLE 对这些分析物进行萃取。样品之间的平均总进样时间为 10 秒。与当前耗时 10 分钟的色谱 LC/TOF 方法相比，RF/Q-TOF 将该时间范围缩短至 1/60。所用的 RF 设置（表 2）包括较短的载样时间，以使亲水性非常强的吗啡保留在小柱上。

表 1. ELISA 筛查的分析物

用于 RF/Q-TOF 分析的初始目标分析物				
分析物	母离子质量数	目标浓度 (ng/mL)	碰撞能量 (V)	样品
安非他明	136.1121	100	10	5
甲基苯丙胺	150.1277	400	10	5
MDA	180.1019	100	10、20、40	6
MDMA	194.1176	100	10、20、40	6
眠尔通	219.1339	200	10、20	7
PCP	244.206	50	10、20、40	6
卡立普多	261.1809	200	10、20	7
曲马多	264.1958	100	10、20、40	7
EDDP	278.1903	100	10、20、40	6
地西洋	285.0789	250	10、20、40	2
吗啡	286.1438	250	40	1
氢吗啡酮	286.1438	100	40	3
苯甲酰爱康宁	290.1387	100	10、20、40	5
可待因	300.1594	50	10、20	1
氢可酮	300.1594	250	20	3
羟吗啡酮	302.1387	100	10、20	4
可卡因	304.1543	100	10、20、40	7
唑吡坦	308.1757	100	10、20、40	6
阿普唑仑	309.0902	100	10、20	8
美沙酮	310.2165	100	10、20、40	6
氯硝西洋	316.0484	100	10、20	8
氧可酮	316.1543	250	10、20	4
劳拉西洋	321.0192	100	10、20	8
6-乙酰吗啡	328.1543	25	10、20	1
芬太尼	337.2274	10	10、20、40	8
丁丙诺啡	468.3108	20	10、20、40	8

表 2. Agilent RapidFire 365 条件

Agilent RapidFire 365 条件	
缓冲液 A (泵 1)	0.1% 甲酸的 HPLC 级水溶液；流速 1.5 mL/min
缓冲液 B (泵 2)	0.1% 甲酸的 90% HPLC 级甲醇:10% HPLC 级水溶液；流速 1.25 mL/min
缓冲液 C (泵 3)	0.1% 甲酸的 90% HPLC 级甲醇:10% HPLC 级水溶液；流速 0.6 mL/min
水溶液清洗	HPLC 级水
有机溶液清洗	LC/MS 级乙腈
进样量	10 µL
SPE 柱	Agilent RapidFire C 类小柱 (反相 C18, 部件号 G9205A)
RF 状态 1	600 ms
RF 状态 2	1500 ms
RF 状态 3	0 ms
RF 状态 4	6200 ms
RF 状态 5	500 ms

较长的洗脱时间 (RF 状态 4) 和较低的泵 3 流速 (0.6 mL/min) 导致峰变宽, 从而得到更大的面积, 以使用自动 MS/MS 进行分析。表 3-5 列出了 Q-TOF 离子源、调谐和自动 MS/MS 数据采集设置。

表 3. Agilent 6545 LC/Q-TOF 离子源和调谐条件

Agilent 6545 LC/Q-TOF 离子源条件	
离子模式	正
离子源	安捷伦双 AJS ESI 离子源
毛细管电压	3500 V
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	12 L/min
雾化器压力	45 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	125 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
质量数范围	低 (1700 m/z)
快速极性转换	禁用
限幅器模式	高分辨率
仪器模式	扩展动态范围 (2 GHz)
参比质量	121.050873 和 922.009798

表 4. Agilent 6545 LC/Q-TOF 采集和参比质量条件

Agilent 6545 LC/Q-TOF 自动 MS/MS 条件	
MS 范围	50–1000 m/z
MS 采集速率	20 张谱图/秒
MS/MS 范围	50–500 m/z
MS/MS 采集速率	5 张谱图/秒
分离峰宽	中等 (约 4 m/z)
碰撞能量	10、20、40 V
每个循环的最大母离子数	10
绝对阈值	1000 响应值
相对阈值 (%)	0.01 %
主动排除	启用
在该时间点后排除	1 张谱图
在该时间点后发布	0.1 min
使用 PC 决定 MS/MS 结果	禁用 (如果启用, 将覆盖“碰撞能量”选项卡)
同位素模型	常见有机分子
主动母离子电荷态选择和偏好	1, 未知
仅按丰度对母离子进行排序	启用
扫描速度根据母离子丰度而异	启用
目标	25000 响应值/质谱图
使用 MS/MS 累积时间限	启用
剔除在时限内无法达到目标 TIC 的母离子	禁用
纯度严格性	0%
纯度临界值	0%

表 5. Agilent 6545 LC/Q-TOF 优选/排除条件

Agilent 6545 LC/Q-TOF 自动 MS/MS 优选/排除表示例							
开	母离子 $m/z$	$\Delta m/z$ (ppm)	Z	母离子类型	RT (min)	$\Delta RT$ (min)	Iso. 宽度
激活	121.050873	100	1	排除	0	1	中等 (约 4 $m/z$ )
激活	922.009798	100	1	排除	0	1	中等 (约 4 $m/z$ )
激活	136.1121	100	1	优选	1	5	中等 (约 4 $m/z$ )
激活	150.1277	100	1	优选	1	5	中等 (约 4 $m/z$ )
仅使用优选离子列表			启用				

## 实验部分

### RapidFire/Q-TOF 条件

Agilent RF/Q-TOF 系统包括如下模块：

Agilent RapidFire 365 和 Agilent 6545 四极杆飞行时间液质联用系统，使用 Agilent MassHunter 采集软件 (B.09.00) 与定性分析导航软件 (B.08.00)、定性分析工作流程 (B.08.00)、PCDL 管理软件 (B.08.00) 和 RapidFire 采集软件 (5.0.0.18130)。样品分析速率为 10 秒/样品。使用自动 MS/MS 采集方法检测并碎裂优选的母离子质量数。安捷伦定性分析工作流程参考由安捷伦创建的 PCDL 来提供数据库和谱库搜索分值。

### 化学品与试剂

所有分析物均购自 Cerilliant (Round Rock, Texas)。HPLC 级水和甲醇购自 Honeywell (Mexico City, Mexico)。LC/MS 级乙腈和异丙醇购自 Honeywell。HPLC 级二氯甲烷购自 Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts)。浓盐酸和氢氧化铵购自 Fisher Scientific。HPLC 级甲基叔丁基醚购自 MilliporeSigma (Burlington, Massachusetts)。高纯度甲酸购自 ProteoChem (Hurricane, Utah)。人全血来自 BioIVT (Westbury, New York)。

### 样品前处理

采用表 1 所列的目标浓度，将目标药物加入多个样品中，并使用以下步骤进行萃取：

- 首先，将 500  $\mu\text{L}$  人全血等分到 12  $\times$  75 mm 玻璃试管中，并加入 500  $\mu\text{L}$  0.1% 氢氧化铵（水溶液）作为缓冲液
- 涡旋混合 10 秒后，使用带有塑料吸头的移液器将样品上样至 Biotage 的 1 mL SLE+ 柱（部件号 820-0140-C）。通过 System 48 CEREX 压力处理装置下施加 5 psi 的正压并持续 5 秒，然后使样品在环境压力下结合 5 分钟
- 在 5 分钟内，使用二氯甲烷:异丙醇 (95:5, v/v, 1  $\times$  2.5 mL) 通过重力将目标分析物洗脱到 13  $\times$  100 mm 玻璃试管中，然后在 5 psi 的正压下处理 5 秒。每次等分试样后，用甲基叔丁基醚 (2  $\times$  2.5 mL) 通过重力进一步洗脱 5 分钟，然后在 5 psi 的正压下处理 5 秒
- 在 20 秒内，采用 15 psi 的最终正压脉冲产生待蒸发的最终等分试样
- 采用 Biotage Turbo Vap LV 和以下梯度，在 100  $\mu\text{L}$  盐酸 (0.05%，甲醇) 存在下，使提取物在 40  $^{\circ}\text{C}$  下蒸发：

- 1 min (1.0 L/min)
- 3 min (1.6 L/min)
- 8 min (3.0 L/min)

- 完全蒸干后，用 500  $\mu\text{L}$  HPLC 级水:甲醇 (90:10, v/v) 将样品复溶，得到略显混浊的提取物。将样品转移至安捷伦 0.5 mL 聚丙烯 96 孔板（部件号 5042-1386）中，执行 RF/Q-TOF 数据采集

### 数据分析

将 MassHunter 采集软件与 RF 采集软件结合使用，执行系统控制和数据采集。将定性分析工作流程与 PCDL 管理软件结合使用，完成数据分析。

使用自动 MS/MS 查找化合物挖掘算法构建化合物发现工作流程，将谱库/数据库的正向和反向得分设置为 0，以捕获所有化合物。数据库搜索设置仅使用质量数作为匹配条件，允许误差为 10 ppm。由于 RapidFire 系统不提供色谱分离，因此无需进行保留时间匹配。在本研究中，仅考察由 +H 电荷载体产生的母离子。将数据库评分的总得分贡献设置为质量数得分 100，并将同位素间距设为 5。根据在 10 V、20 V 或 40 V 下目标离子碎裂所产生的平均反向得分，计算谱库得分。

将碎裂数据与包含目标分析物的唯一谱图的 PCDL 进行比较。最终总分加权为 50/50，由数据库和谱库得分组成。

## 结果与讨论

数据库得分表明所采集谱图的母离子质量数与已知谱图的质量数接近程度。谱库得分表明所采集谱图的碎裂模式与已知谱图的碎裂模式的接近程度。在初始运行中，每种优选的母离子质量数均使用 10 V、20 V 和 40 V 的 CE。然后将这些得分与提取的空白血液样品进行比较，以确定最佳 CE，该 CE 应使加标样品获得避免同质异位干扰的独特碎裂模式（表 6）。安非他明、甲基苯丙胺、氢吗啡酮和吗啡以异常高的得分出现在空白血液中，这使真正的目标物难以检

测，并导致大量假阳性结果。通过针对安非他明和甲基苯丙胺排除 20/40 V 的 CE，并针对吗啡/氢吗啡酮排除 10/20 V 的 CE，可以将真实目标物与假阳性结果区分开。与空白血液相比，加标全血中目标药物的谱库得分相对较高（表 6）。使用优化的 CE 所得到的加标吗啡得分最低 (67.11)，但与空白血液样品的得分 (11.14) 之间很容易区分。在不采用 LC/Q-TOF 的典型色谱分离的情况下，使用 RF/Q-TOF 时，高分辨率精确质谱匹配碎裂数据可提供足够高的可信度，以区分真正的目标物与假阳性结果。

表 6. ELISA 筛查的分析物的 CE 对比

分析物	数据库得分	使用所有 CE (10、20、40 V) 得到的谱库得分		使用最佳 CE 得到的谱库得分 (参见表 1)	
		“空白”血液	加标血液	“空白”血液	加标血液
安非他明	97.19	14.64、76.35、62.06	98.52、99.98、97.27	2.26	97.17
甲基苯丙胺	97.54	17.19、91.01、78.23	99.99、100、99.99	17.19	99.93
MDA	96.91	0、32.21、32.39	98.06、96.68、93.14	5.65、0、4.06	96.68、93.66、91.9
MDMA	99.75		99.21、98.28、94.57		98.36、92.45、96.49
眠尔通	96.2	0、0、85.16	86.9、90.07、86.4	0、32.64	70.03、79.59
PCP	99.97		91.59、91.35、91.3		93.3、89.29、89.36
卡立普多	95.1	4.11、31.9、55.24	96.63、98.45、99.74		96.43、95.39
曲马多	94.97		99.39、100、100		98.08、100、100
EDDP	99.92		100、99.78、96.64		98.55、99.5、88.66
地西洋	99.75		99.87、90.61、84.06		99.89、88.87、83.8
吗啡	98.93		100、98.27、70.22	11.14	67.11
氢吗啡酮	99.34	98.62、78.44、5.94	99.79、93.14、54.94		72.12
苯甲酰爱康宁	96.76		98.88、95.8、89.33		96.9、96.95、82.48
可待因	94.97		100、94.42、27.29		100、94.61
氢可酮	89.67		99.99、98.75、83.53		93.14
羟吗啡酮	99.2		93.31、78.29、40.01		92.68、85.98
可卡因	99.79		97.19、96.33、89.49		98.1、97.84、87.78
唑吡坦	99.92		96.13、97.68、90.91		99.53、98.53、98.11
阿普唑仑	97.25		99.53、95.27、84.08		96.82、95.32
美沙酮	96.93		91.46、94.69、94.93		98.75、98.7、98.34
氯硝西洋	99.35		99.79、86.38、38.28		99.6、97.4
氧可酮	96.62		97.79、94.4、62.71		97.39、97.74
劳拉西洋	99.79		74.71、64.23、20.58		95.17、93.95
6-乙酰吗啡	99.85		100、96.19、58.35		100、96.17
芬太尼	96.27		98.88、78.31、92.94		98.47、86.74、93.24
丁丙诺啡	99.61		100、100、82.14		100、100、85.84

测试 RF/Q-TOF 用于血液中药物快速准确筛查可行性的下一步，是对该方法与我们实验室中目前使用的尸检血液筛查方法进行比较，后者包括 263 种目标分析物。图 1 展示了当前使用的 LC/TOF 方法（上图）与 RF/Q-TOF 方法（下图）之间的时间对比。采用 LC/TOF 进行分析时，每次进样需要 10 分钟，而利用 RF/Q-TOF 进行分析时只需 10 秒。这使得样品通量提高 60 倍。

表 7 汇总了采用 LC/TOF 和 RF/Q-TOF 方法所得到的结果的直接比较。使用现有的 LLE 方法对 26 个样品进行前处理，并用 LC/TOF 进行分析。然后对每个样品的剩余提取物进行 RF/Q-TOF 分析，不经进一步改性。在 26 个样品中，使用 LC/TOF 和 RF/Q-TOF 方法确定 121 种分析物的结果呈阳性。RF/Q-TOF 共报告了 10 种假阳性分析物，但这是基于未优化的 CE 所

得到的结果。手动数据调查显示，使用优化的 CE 可以避免所有 10 个假阳性结果。最后，使用两种方法均未检出的分析物有 132 种。

表 7. LC/TOF 与 RF/Q-TOF 之间的阳性结果比较。手动数据调查显示，仅使用最佳 CE 时，可消除假阳性结果

N = 26	LC-TOF 正离子模式	LC-TOF 负离子模式
RF/Q-TOF 正离子模式	121	10*
RF/Q-TOF 负离子模式	0	132**

\* 40 V 并非最佳 CE

\*\* 两种方法均未检出的化合物有 132 种

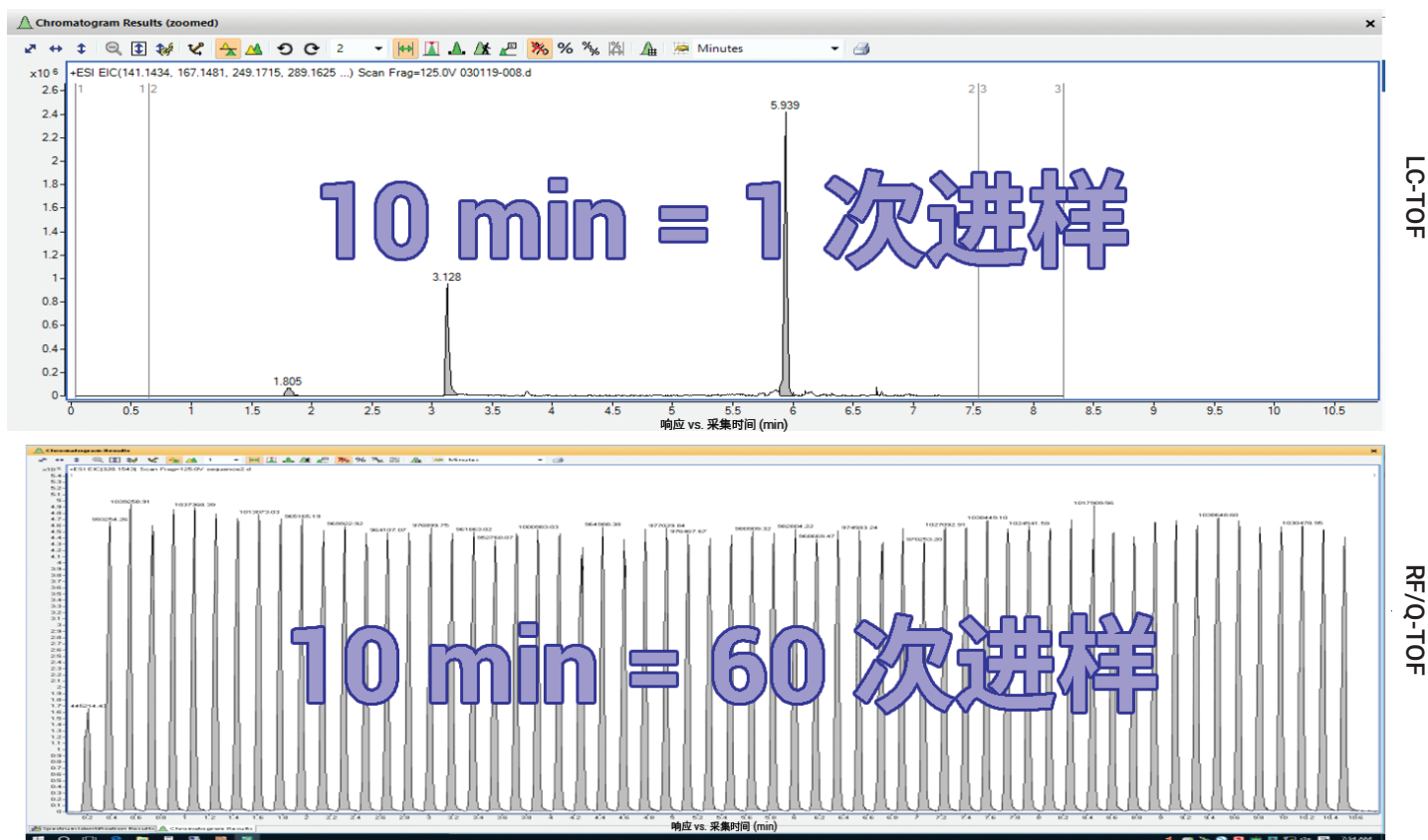


图 1. LC/TOF 与 RF/Q-TOF 之间的进样比较

## 结论

对一部分经过 ELISA 筛查的分析物进行研究，证明 Agilent RF/Q-TOF 能够用作对人全血进行高速药物筛查的平台。将自动 MS/MS 与 PCDL 结合使用，可以准确区分真实的阳性样品和大量的同质异位干扰物质。RF/Q-TOF 方法提供的结果与实验室中当前所用 LC/TOF 筛查方法的结果相当，同时将样品通量提高了 60 倍。分析尸检样品中是否存在各种药物时，此方法的进一步开发可能对法医药物界极为有益。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://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，2019  
2019年9月26日，中国出版  
5994-1391ZHCN

