

# 快速 LC/TOF MS 用于临床研究实验室 中药物的分析筛查

## 作者

Adam Barker<sup>1,2</sup>、  
Frederick G. Strathmann<sup>3</sup>、  
Natalie N. Rasmussen<sup>4</sup>  
和 Carrie J. Adler<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ARUP 临床和实验病理学研究所，美国犹他州盐湖城

<sup>2</sup> 犹他大学病理学系，美国犹他州盐湖城

<sup>3</sup> NMS 实验室，美国宾夕法尼亚州威洛格罗夫

<sup>4</sup> 安捷伦科技有限公司，  
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

## 摘要

免疫分析技术历来是临床研究中药物筛查的首选分析方法。对生物样本中的目标分析物进行假定检测时，通常需要更具体的确证试验，其中最常用的为气相色谱或液相色谱（GC 或 LC）与串联质谱（MS/MS）联用。然而，不正确的假定免疫分析结果导致需要额外试验的情况在分析物检测中时有发生，其可能对实验操作和总成本带来实质性的不良后果。为了解决这一问题，我们开发了一种包含 84 种药物和代谢物的 LC/TOF MS 方法，该方法可用于药物筛查并可改善整体数据质量。

## 前言

基于免疫分析的技术相对快速且简单，是历来进行尿液样本中药物筛查的首选分析方法。样品中的目标分析物需要更具特异性的确证试验，其中最常使用 GC 或 LC 串联 MS/MS。不正确的假定免疫分析结果是一个常见问题，其可能导致严重不良后果。我们开发了 84 种药物和代谢物的快速 LC/TOF MS 分析方法用于代替免疫分析技术。与 MS/MS 相比，LC/TOF MS 具有更多优势，包括不受通道数限制，在更为紧缩的分析窗口内可以识别大量药物，以及只需推定的结果即可建立方法和分析数据。此外，LC/TOF MS 作为假定分析方法时可减少对抗体可用性及其性能的依赖。同时，与不断购买商业化的免疫分析试剂盒相比，LC/TOF MS 成本更低，且在不大量修改工作流程或不使用单独的检测试剂盒的情况下即可轻松添加其他化合物。本研究表明，使用 LC/TOF MS 方法可成功替代基于免疫分析的检测技术，通过 LC / TOF MS 方法可获得更好的数据质量和包含肌酐量化的样本有效性评估。

## 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 (G7167A)				
Agilent 1290 Infinity 高容量柱温箱 (G7116B)				
进样针清洗	乙腈			
自动进样器温度	4 °C			
进样量, 正离子	2 µL			
进样量, 负离子	5 µL			
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C8, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm 液相色谱柱 (部件号 689775-906T)			
柱温	75 °C			
流动相 A, 正离子	5 mmol/L 甲酸铵水溶液, pH 3.5			
流动相 B, 正离子	0.1% 甲酸乙腈溶液			
流动相 A, 负离子	0.1% 乙酸水溶液			
流动相 B, 负离子	甲醇			
流速	1 mL/min			
梯度	正离子模式	负离子模式		
	时间 (min)	%B	时间 (min)	%B
	0.00	2	0.00	15
1.25	95	1.25	95	
再平衡时间	0.5 分钟			

### LC/TOF 质谱仪配置和参数

配置	
Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (在 TOF 模式下操作)	
电离模式	正离子和负离子
干燥气温度	250 °C
干燥气流速	15 L/min
雾化器压力	60 psi
鞘气温度	400 °C
鞘气流速	12 L/min
正离子化的喷嘴电压	0 V
负离子化的喷嘴电压	0 V, 0.8 分钟时为 500 V
毛细管电压	3500 V
碎裂电压	125 V
锥孔电压	65 V
八极杆射频电压	750 V
质量数范围	100–1000 m/z
采集速率	4 幅谱图/秒
检测器采集速率	2 GHz, 扩展的动态范围
参比质量流速 Agilent 1260 等度泵	0.5 mL/min
参比质量, 正离子	121.0509 和 922.0098
参比质量, 负离子	119.0360 和 980.0163

## 化学品与试剂

Optima 级甲醇和乙腈来自 Fisher Scientific (Hampton, NH)。冰醋酸和甲酸购自 MilliporeSigma (Saint Louis, MO)。临床实验室试剂用水 (CLRW) 由 MilliporeSigma 生产的 Milli-Q Advantage A10 系统提供。药物和代谢物的储备标准品及氘化内标物购自 Cerilliant Corporation (Round Rock, TX)。肌酸酐购自 MilliporeSigma，肌酸酐-d<sub>3</sub> 购自 CDN Isotopes (Pointe-Claire, Quebec, Canada)。肌酸酐参比标准品购自 NIST (Gaithersburg, MD)。参比质量溶液和低浓度调谐混合物来自安捷伦科技公司 (加利福尼亚州圣克拉拉市)。

## 样品前处理

使用三份单独的样品检测所有目标化合物并对肌酸酐进行定量。相关化合物的名称、极性、保留时间、目标浓度和内标信息见表 1。

表 1. 分析物及相关内标

分析物	内标	目标物 (ng/mL)	保留时间 (min)	极性
2-羟乙基氟安定	地西洋-d <sub>5</sub>	200	1.291	正
3-羟基可替宁	吗啡-d <sub>3</sub>	100	0.432	正
6-单乙酰吗啡 (3)*	6-单乙酰吗啡-d <sub>6</sub>	300	1.025	正
7-氨基氯硝西洋*	哌替啶-d <sub>4</sub>	200	1.146	正
阿普唑仑*	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	200	1.320	正
阿米替林 (8)	哌替啶-d <sub>4</sub>	100	1.262	正
异戊巴比妥	苯巴比妥-d <sub>5</sub>	200	0.995	负
安非他明	甲基苯丙胺-d <sub>5</sub>	300	0.723	正
新烟碱	吗啡-d <sub>3</sub>	100	0.370	正
α-羟基阿普唑仑	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	200	1.266	正
α-羟基咪达唑仑	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	200	1.274	正
α-羟基三唑仑	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	200	1.270	正
苯甲酰爱康宁*	苯甲酰爱康宁-d <sub>3</sub>	150	1.079	正
丁丙诺啡-葡萄糖苷	苯巴比妥-d <sub>5</sub>	200	0.885	负
丁丙诺啡*	哌替啶-d <sub>4</sub>	5	1.216	正
布他比妥	苯巴比妥-d <sub>5</sub>	200	0.910	负
卡立普多	地西洋-d <sub>5</sub>	100	1.291	正
甲氧二氮草	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	200	1.249	正
氯丙咪嗪	地西洋-d <sub>5</sub>	200	1.312	正
氯硝西洋	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	200	1.278	正
可卡因	苯甲酰爱康宁-d <sub>3</sub>	150	1.150	正
可待因 (1)	吗啡-d <sub>3</sub>	300	0.942	正
可铁宁*	吗啡-d <sub>3</sub>	100	0.847	正
去烷基氟拉西洋	地西洋-d <sub>5</sub>	200	1.303	正
地昔帕明	哌替啶-d <sub>4</sub>	100	1.262	正
地西洋	地西洋-d <sub>5</sub>	200	1.357	正
多塞平*	哌替啶-d <sub>4</sub>	100	1.233	正
EDDP (8)	哌替啶-d <sub>4</sub>	150	1.270	正
乙基葡萄糖醛酸苷	苯巴比妥-d <sub>5</sub>	500	0.182	负
硫酸乙酯	苯巴比妥-d <sub>5</sub>	500	0.182	负
芬太尼*	去甲芬太尼-d <sub>5</sub>	2	1.229	正
氟拉西洋	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	200	1.241	正
氢可酮 (1)	6-单乙酰吗啡-d <sub>6</sub>	300	1.029	正
氢吗啡酮 (2)	吗啡-d <sub>3</sub>	300	0.420	正
丙咪嗪	哌替啶-d <sub>4</sub>	100	1.278	正
劳拉西洋	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	200	1.274	正
劳拉西洋葡萄糖苷	苯巴比妥-d <sub>5</sub>	200	0.978	负
MDA	甲基苯丙胺-d <sub>5</sub>	500	0.909	正

\* QC 分析物；(序号) 同质异位化合物

### 正离子模式前处理 (10 倍稀释)

将校准品、质量控制 (QC) 物质和样品 (100 µL) 均分于 96 孔板中。将溶于 IMCSZyme 快速水解缓冲液的试卤灵葡萄糖苷酸加入各孔, 然后加入 IMCSZyme β-葡萄糖醛酸酶, 如之前所述<sup>5</sup>。将孔板短暂离心使内容物聚集于底部, 然后 65 °C 孵育 15 分钟。孵育结束后加入 20 µL 内标工作储备液。然后用 880 µL 的 98:2 5 mmol/L 甲酸铵水溶液, pH 3.5 (流动相 A, 正离子模式) 和 0.1% 甲酸 Optima 级乙腈溶液 (流动相 B, 正离子模式) 稀释。将孔板短暂离心, 使液体收集于孔底部。

### 负离子模式前处理 (10 倍稀释)

将校准品、QC 物质和患者样本 (10 µL) 均分于 96 孔板中, 加入 5 µL 内标工作储备液。用 85 µL 的 85:15 0.1% 乙酸 CLRW 和甲醇溶液稀释样本, 短暂离心使液体收集于孔底部。

### 肌酸酐样品前处理 (50 倍稀释)

将校准品、QC 物质和患者样本 (10 µL) 均分于 96 孔板中, 加入 10 µL 肌酸酐-d<sub>3</sub> 内标。使用 500 µL 98:2 正离子模式流动相 A:流动相 B 作为稀释溶液。将孔板短暂离心, 使液体收集于孔底部。

分析物	内标	目标物 (ng/mL)	保留时间 (min)	极性
MDEA	甲基苯丙胺-d <sub>5</sub>	500	1.071	正
MDMA	甲基苯丙胺-d <sub>5</sub>	500	1.013	正
哌替啶	哌替啶-d <sub>4</sub>	50	1.158	正
眠尔通	哌替啶-d <sub>4</sub>	100	1.162	正
美沙酮	地西洋-d <sub>5</sub>	150	1.299	正
甲基苯丙胺 (6)*	甲基苯丙胺-d <sub>5</sub>	300	1.013	正
哌甲酯 (5)	哌替啶-d <sub>4</sub>	无筛查	1.137	正
咪达唑仑	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	200	1.266	正
吗啡 (2)*	吗啡-d <sub>3</sub>	300	0.287	正
纳洛酮 (3)	6-单乙酰吗啡-d <sub>6</sub>	无筛查	0.893	正
N-去甲基他喷他多	哌替啶-d <sub>4</sub>	100	1.121	正
尼古丁	吗啡-d <sub>3</sub>	100	0.266	正
硝西泮	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	200	1.266	正
去甲丁丙诺啡-葡萄糖苷酸	苯巴比妥-d <sub>5</sub>	300	0.462	负
去甲丁丙诺啡	哌替啶-d <sub>4</sub>	300	1.179	正
去甲氯丙咪嗪 (N-去甲基氯丙咪嗪)	地西洋-d <sub>5</sub>	200	1.303	正
去甲西洋	地西洋-d <sub>5</sub>	200	1.312	正
去甲多塞平 (去甲基多塞平)	哌替啶-d <sub>4</sub>	100	1.224	正
去甲芬太尼	去甲芬太尼-d <sub>5</sub>	2	1.100	正
去甲氢可酮 (2)	6-单乙酰吗啡-d <sub>6</sub>	300	1.009	正
去甲哌替啶 (5)	哌替啶-d <sub>4</sub>	50	1.137	正
去甲尼古丁	吗啡-d <sub>3</sub>	100	0.258	正
去甲羟考酮 (7)	吗啡-d <sub>3</sub>	300	0.967	正
去甲氧吗啡酮	吗啡-d <sub>3</sub>	300	0.283	正
去甲替林 (9)	哌替啶-d <sub>4</sub>	100	1.270	正
N-去甲基曲马多 (4)	哌替啶-d <sub>4</sub>	200	1.133	正
O-去甲基曲马多 (4)	6-单乙酰吗啡-d <sub>6</sub>	200	1.029	正
奥沙西洋*	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	200	1.266	正
奥沙西洋葡萄糖苷酸	苯巴比妥-d <sub>5</sub>	200	0.952	负
羟考酮	6-单乙酰吗啡-d <sub>6</sub>	100	1.000	正
羟吗啡酮 (7)	吗啡-d <sub>3</sub>	100	0.345	正
PCP*	哌替啶-d <sub>4</sub>	25	1.220	正
戊巴比妥	苯巴比妥-d <sub>5</sub>	200	0.995	负
苯巴比妥*	苯巴比妥-d <sub>5</sub>	200	0.732	负
芬特明 (6)	甲基苯丙胺-d <sub>5</sub>	100	1.038	正
普罗替林 (9)	α-羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	100	1.270	正
利他林酸*	甲基苯丙胺-d <sub>5</sub>	100	1.054	正
司可巴比妥	苯巴比妥-d <sub>5</sub>	200	1.029	负

\* QC 分析物; (序号) 同位异位化合物

## 数据分析

采用 MassHunter 采集软件 (B.08.00) 进行数据采集。使用 MassHunter 定量分析软件 (B.08.00) 和定性分析软件 (B.07.00) 分析数据。目标物浓度与各自的免疫分析相匹配。84 种药物和代谢物的测定基于目标物定量、精确质量数 (7 ppm 内) 和保留时间的匹配 ( $\pm 0.010$  分钟内)。表 1 列出了目标物浓度和保留时间。对于正离子模式和负离子模式，目标物的单点校准强制性通过原点，以此来确定阳性或阴性。每类药物的 QC 物质为目标物浓度的 50% (阴性对照) 和 125% (阳性对照)。所有分析物归一化为 11 种内标物中的 1 种，其中九种为正离子模式，两种为负离子模式。为了确保充分水解，对试卤灵和试卤灵葡萄糖苷酸进行定性分析。所有阳性 QC 重复均定性为阳性，所有阴性 QC 重复均定性为阴性，所有化合物均得到鉴定。使用额外样品，随后进样未检测到的对照样品进行测定，所有化合物的交叉污染  $< 0.1\%$ 。

## 肌酸酐定量

肌酸酐使用 20、100、200、300 和 400 mg/dL 的浓度绘制 5 点校准曲线。以 QC 物质对校准进行验证，目标物浓度为 27.5、87.7、232.5 和 360.1 mg/dL。由于尿液中肌酸酐的浓度及仪器的灵敏度均较高，因此以肌酸酐的第一个同位素确定每个样品中的浓度。

分析物	内标	目标物 (ng/mL)	保留时间 (min)	极性
他喷他多	哌替啶-d <sub>4</sub>	100	1.129	正
他喷他多-O-硫酸盐 (7.5–13 ppm)	地西洋-d <sub>5</sub>	200	1.104	正
替马西洋	地西洋-d <sub>5</sub>	200	1.312	正
$\Delta 9$ -COOH-THC 葡萄糖苷酸*	11-nor-9-COOH-THC-d <sub>3</sub>	20	1.198	负
曲马多	哌替啶-d <sub>4</sub>	200	1.133	正
三唑仑	地西洋-d <sub>5</sub>	200	1.324	正
唑吡坦*	哌替啶-d <sub>4</sub>	20	1.187	正
肌酸酐	吗啡-d <sub>3</sub>	20 mg/dL	0.177	正
内标	工作储备液浓度 (ng/mL)	样品中终浓度 (ng/mL)		
去甲芬太尼-d <sub>5</sub>	1000	20	1.096	正
THC-COOH-d <sub>3</sub>	2000	10	1.257	负
吗啡-d <sub>3</sub>	2000	40	0.283	正
苯甲酰爱康宁-d <sub>3</sub>	2000	40	1.079	正
地西洋-d <sub>5</sub>	2000	40	1.357	正
6-乙酰吗啡-d <sub>6</sub>	2000	40	1.021	正
哌替啶-d <sub>4</sub>	2000	40	1.154	正
$\alpha$ -羟基阿普唑仑-d <sub>5</sub>	2000	40	1.266	正
苯巴比妥-d <sub>5</sub>	4000	20	0.724	负
甲基苯丙胺-d <sub>5</sub>	8000	160	0.930	正
肌酸酐-d <sub>3</sub>	5200	52 mg/dL	0.177	正

\* QC 分析物；(序号) 同质异位化合物

## 结果与讨论

表 2 列出了以 LC/MS/MS 或 LC/Q-TOF MS 作为确证方法得到的阳性和阴性结果。为了测试方法性能，对通过免疫分析筛查仍需 MS 确证的 420 个独立生物样本进行分析。

### EMIT 假阳性

除 PCP、THC 和曲马多外，采用免疫分析法的每一类药物至少有一个为假阳性结果。MDMA 出现假阳性结果的数量最多，共有 50 个阳性结果未通过 LC/MS/MS 确证。此外，筛查出为哌替啶阳性的七个样本均未通过确证。总的来说，420 个生物样品的免疫分析结果中，有 117 个未通过 MS 的进一步确证，表明免疫分析结果易出现假阳性。

### LC/TOF MS 假阳性

采用 LC/TOF MS 分析样本得到的结果进一步以 LC/MS/MS 或 LC/TOF MS 进行确证时未出现假阳性。

### EMIT 假阴性

LC/TOF MS 分析发现了另外 44 个阳性结果：

- 22 个苯二氮卓类药物
- 九个阿片类药物
- 五个乙醇标记物
- 四个 THC
- 可卡因和巴比妥类药物各两种

### LC/TOF MS 假阴性

由于浓度低于所建立的目标物浓度，LC/TOF MS 未能在一个样品中检测到丁丙诺啡、乙醇标记物和阿片类药物。

表 2. 用 LC/TOF MS 或 LC/MS/MS 作为确证方法时免疫分析方法和 LC/TOF MS 方法的灵敏度和特异性

药物类别	免疫分析				LC/TOF MS			
	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN
安非他明	50	350	20	20	50	370	0	0
巴比妥类	7	711	1	2	9	411	0	0
苯二氮卓类	66	328	4	22	87	333	0	0
丁丙诺啡	12	203	1	0	12	203	0	1
大麻素	90	326	0	4	94	326	0	0
卡立普多	3	212	1	0	3	213	0	0
可卡因	18	399	1	2	20	400	0	0
乙醇葡萄糖苷酸	35	380	0	5	41	378	0	1
芬太尼	38	175	3	0	38	178	0	0
MDMA	0	370	50	0	0	420	0	0
哌替啶	0	209	7	0	0	216	0	0
美沙酮	24	395	1	0	24	396	0	0
阿片类	171	240	3	6	177	243	0	0
羟考酮	92	321	4	3	93	326	0	1
PCP	0	420	0	0	0	420	0	0
他喷他多	1	205	9	0	1	215	0	0
曲马多	18	198	0	0	18	198	0	0
唑吡坦	3	201	12	0	3	213	0	0

TP = 阳性；TN = 阴性；FP = 假阳性；FN = 假阴性

### 尼古丁

579 个生物样本中几乎有一半（275，47.4%）以 LC/TOF MS 分析时筛查出尼古丁和至少两种尼古丁代谢产物。由于在比较研究中使用的样本不包含尼古丁及其代谢物，这些样品既未通过 EMIT 筛查也未通过 LC/MS/MS 方法确证。

### 定量肌酸酐性能特性

尿液中肌酸酐的定量采用 LC/TOF MS，校准品覆盖 20–400 mg/dL 的整个分析

测量范围， $R^2 \geq 0.999$ 。准确性和精确度研究证明了可接受的标准偏差与 Jaffe 方法的分析一致性。在两种 QC 水平下实验间和实验内的不准确度小于 3%。交叉污染为 0.02%。对所有 420 个患者样本进行 Jaffe 方法与 LC/TOF MS 方法的比较，结果显示斜率为 0.91，相关系数为 0.96。这是第一次使用肌酸酐的第一个碳同位素  $^{13}\text{C}_3\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$  来定量高浓度分析物，同时可实现对低浓度分析物采用标准化的样品前处理方法。

## 结论

本应用简报展示了以快速 LC/TOF MS 方法替代免疫分析方法用于药物筛查和肌酸酐定量，与现有方法相比，其特异性和准确度更高。LC/TOF MS 方法用于药物筛查时灵敏度更高，特异性更好，且可用于肌酸酐的定量分析。如需应用于临床，还需要进一步的研究。

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，2018  
2018年8月21日，中国出版  
5994-0189ZHCN

