

人全血中法医类化合物的高灵敏度检测

使用SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS系统 – QTRAP® Ready, SCIEX OS软件

Pierre Negri¹ and Ian Moore²

¹ SCIEX, USA; ² SCIEX, CA

保持可靠定量的同时，也可实现低水平检测是任何稳定生物分析工作流程的关键性能指标。在法医实验室，超宽浓度范围内，对复杂生物基质样本中的大量分析物同时进行精准定量的能力是非常有挑战性的，通常需要稀释样品，以使其处于仪器的线性范围内。为了进一步减少样品制备和再分析时间，要求采集到足够多的化合物色谱峰，并且获得宽线性动态范围，以确保全面的分析物覆盖率和可靠的定量性能。

本技术报告中，SCIEX Triple Quad 7500系统展现出作为一个强大的定量平台，在速度、线性动态范围和灵敏度方面都有优异的表现，可以对49种毒物在人类全血中进行精准定量。被优化的方法很大程度上提高了线性动态范围能力，同时保持所需的准确性和性能水平。新硬件功能，OptiFlow™ Pro离子源、D Jet™离子导向技术和E Lens™技术增强了离子化和脱溶剂效果，¹导致本研究中的一系列待分析物的灵敏度和定量下限大幅度地提高。



SCIEX Triple Quad 7500系统在法医毒物分析中的关键优势

- SCIEX Triple Quad 7500 系统具有优异的灵敏度和定量性能
- SCIEX OS 软件提供了一个包括数据采集和数据处理的，易于使用的、直观的平台
- SCIEX OS软件中的分窗口多反应监测专业版算法（Scheduled MRM™ Algorithm Pro）功能和数据采集中的快速极性切换，实现了快速（6.5min，详见方法中液相条件部分）运行时间
- 稳定、易于使用的OptiFlow Pro离子源提供样品的高效离子化，同时离子源的智能设计消除了物理优化的需求
- 本研究展示，复杂生物基质中的靶向毒物，在改进的脱溶剂和样品离子化效率下，提高了灵敏度，最低定量下限（LLOQ）在ng/mL到pg/mL范围内
- 宽浓度范围，不牺牲任何数据质量，所有毒物进行精准定量
- 系统的整体性能保证了，本研究中优异精度和重现性的获得，即使在低浓度水平上也是如此

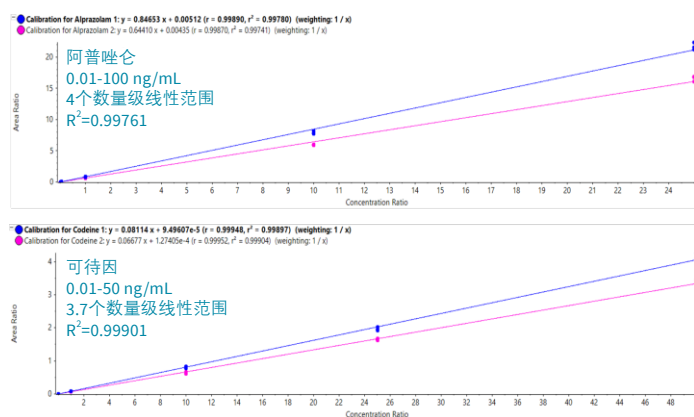


图1. 不同化合物的线性动态范围（LDR）。阿普唑仑（0.01-100 ng/mL）和可待因（0.01-50 ng/mL）的校准曲线显示，即使在pg/mL浓度下，也有良好的线性范围。

实验细节

靶向分析和方案：共49种待分析物和18种氘代内标从Cerilliant公司（Round Rock, TX）购买。甲醇中制备两种溶液：一种是包含49个目标分析物的标准品混合液，一种是包含18个氘代内标的内标混合液。表1列出了49种目标分析物的名称、标准曲线范围、线性相关值（ R^2 ）和LLOQ，以及在LLOQ浓度下的准确性和精密度。

工作曲线准备：使用甲醇配置从10 $\mu\text{g/mL}$ 到 1 pg/mL 的 8个浓度标准溶液。使用MeOH/水（20:80,v/v）配置10 ng/mL 内标储备液，用于样品进样前的复溶溶液。

样品制备：将10 μL 的标准溶液混合到90 μL 的人全血中。使用蛋白沉淀法提取每个被加入人全血样本。简而言之，900 μL 的甲醇/乙腈（50:50, v/v）溶液被加入到人全血样品中，涡流1 min，超声3 min，然后在涡流1 min混合样本。然后在8000 rpm下离心样本5 min。上清液被转移到玻璃管中，并且在氮气下完全吹干。使用500 μL 的10 ng/mL 甲醇/水（20:80, v/v）内标标准溶液复溶样本。蛋白质的沉淀过程如图2所示。

液相条件：ExionLC™系统，使用Phenomenex Kinetex Phenyl-Hexyl色谱柱（50 \times 2.1 mm, 2.6 interxm, 00B-4495-E0）。分离条件与先前技术报告中所述的相同²。流动相为甲酸铵水溶液（MPA）和甲酸甲醇溶液（MPB）。进样量为5 μL ，液相运行时间为6.5 min。



图2. 人全血样品的蛋白沉淀前处理流程。采用9步蛋白质沉淀法从人全血样本中选择性提取待分析物，并使用SCIEX Triple Quad 7500系统进行分析

质谱条件：SCIEX Triple Quad 7500系统，配备OptiFlow分析探针的OptiFlow Pro离子源和E Lens™技术。电喷雾电离（ESI）离子源在正负极性下工作。使用SCIEX OS软件2.0版本中的Scheduled MRM Algorithm Pro功能创建包括134个MRM离子对（98个用于毒物，36个用于内标测定）的简单方法。每个靶向待分析物选择两个MRM离子对进行监测，并将每个样本进样三次进行数据分析。

数据分析：数据处理使用SCIEX OS软件。使用自动峰（AutoPeak）算法在查看窗口内可观察到色谱峰，并对区别于背景的色谱峰进行检测和积分。定量分析在软件的分析模块中进行，生成校准曲线、计算浓度、测定精密度和准确度。

方法开发和优化

一个被稀释的，包含49个目标分析物的纯标准品混合溶液用于初始的方法开发。SCIEX OS软件中的Scheduled MRM Algorithm Pro功能用于优化每个色谱峰的采样，同时确保每个MRM离子对的最佳驻留时间，以确保每个目标分析物色谱峰的可靠积分、定量和确认。此外，使用快速极性切换确保优异的分析物覆盖。本研究中的49个目标分析物，大多数MRM离子对在每个色谱峰上都有15个或更多的扫描点，至少也包括10个扫描点。图3显示了通过已优化数据采集方法采集到的49种目标分析物的洗脱情况。

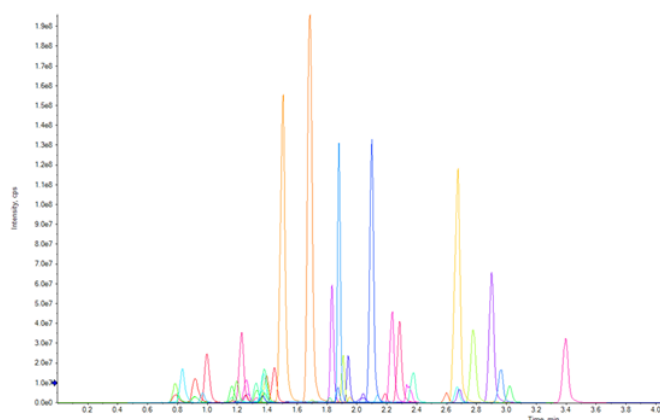


图3. 49种目标分析物色谱图。标准品混合物，优化采集方法下获得的提取离子流色谱图（XICs）。使用SCIEX OS软件的 Scheduled MRM™ Algorithm Pro 功能优化采集方法，即使在MRM离子对共流出非常高的色谱图区域，也能收集到优异的数据质量。

优化后的检测方法确保毒物定量准确可靠

浓度从1 - 0.1 pg/mL的49种目标分析物添加空白人全血样本前制备。使用SCIEX OS软件分析模块中的AutoPeak算法自动检测和积分色谱峰，自动计算分析物浓度和子离子比例。

毒理学病例样本中检测到的药物水平可能出现剧烈变化，因此必须使用具有高线性范围的仪器。图1显示了本研究中两种靶向毒物的校准曲线。阿普唑仑和可待因的浓度范围分别为4 (0.01-100 ng/mL)和3.7 (0.01-50 ng/mL)个数量级的线性动态范围。在分析浓度范围内，优异线性被观察到，阿普唑仑和可待因的R²平均值分别为0.99761和0.99901。类似的趋势，在本研究中其他的分析物上，也被观察到。

OptiFlow Pro离子源和E Lens技术提高灵敏度

对于任何需要从生物样本中提取毒物，进行宽浓度范围定量的毒理实验室来说，开发能够产生高灵敏度的可靠工作流程是至关重要的。为此，我们通过确认49种目标毒物的LLOQ来评估SCIEX Triple Quad 7500系统的灵敏度。被测定的LLOQ值作为最低定量浓度，需要满足以下性能要求：信噪比 (S/N) 至少为10，实测浓度对照真实浓度的准确度小于20%，精度 (%偏差) 低于25%，用于线性校准曲线的计算的R²值至少为0.98。

图4显示了7-羟基帽柱碱 (图4A) 和乙酰芬太尼 (图4B) 两种MRM离子对的提取离子流图 (XIC) 和校准曲线。这两个化合物的定量和定性离子的提取离子流图显示出高水平的灵敏度，并展示了0.1-100 ng / mL 7-羟基帽柱碱和0.02 -50 ng / mL乙酰芬太尼标准曲线内的各浓度点优异的准确度。用标准曲线上的6个浓度点来确定这两种目标化合物的定量离子和定性离子的离子比率标准。结果表明，即使在标准曲线涵盖的浓度范围远远超过常规生物分析要求的情况下，标准曲线也具有良好相关性。

表1总结了在人全血中添加的49种目标分析物的统计结果。该表包括标准曲线范围、线性相关系数 (R²值) 和LLOQ，以及每种药物监测两个的MRM离子对的准确性和精密度。总体而言，该方法具有良好的重现性、精密度、准确度和线性，证明了所建立方法的可靠性和性能。

图5展示了二氢可待因 (图5A) 和去氧可酮 (图5B) 在0.5 ~ 100ng /mL浓度范围内，峰面积积分的统计结果和标准曲线结果。在标准曲线上六个浓度点覆盖的浓度范围内，展示优异的重现性，准确性和精密度。二氢可待因的分析结果展示良好的精密度和准确度，其定量离子和定性离子的平均R²分别为0.99571和0.99323。SCIEX OS软件实现了全流程定量，为快速、直观、精简的数据处理而设计，结果准确可靠。

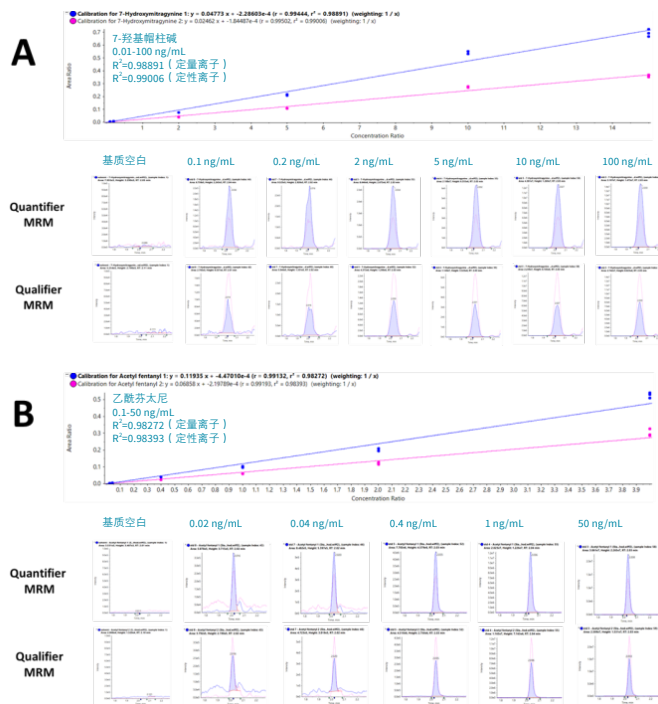


图4. 部分毒物的高选择性和灵敏度。A) 7-羟基帽柱碱，0.1-100 ng / mL，两个离子对校准曲线和提取离子流图。B) 乙酰芬太尼，0.02-50 ng / mL，两个离子对校准曲线和提取离子流图。校准曲线和提取离子流图显示了良好的线性和灵敏度。

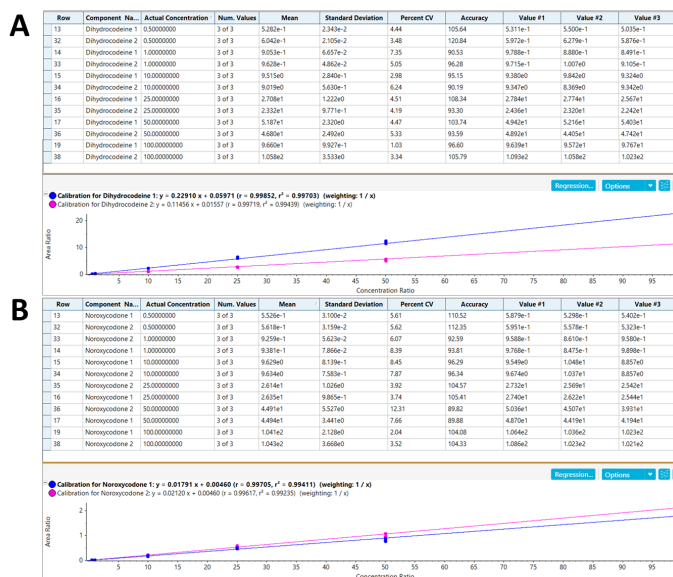


图5. 部分化合物的统计结果和标准曲线。二氢可待因 (A) 和去氧可酮 (B) 0.5 - 100 ng / mL 的统计窗口和校准曲线。这两种分析物在校准曲线的6各浓度点上都显示了良好的线性、重现性、准确性和精密度，证明了该方法的整体稳健性。

结论

本文描述了使用SCIEX Triple Quad 7500系统检测人全血中49种毒物的优化且灵敏的方法。SCIEX OS软件中的Scheduled MRM Algorithm Pro功能实现了数据采样方法的优化。新硬件OptiFlow Pro离子源、D Jet离子导向技术和E Lens技术提供了对所有目标毒物亚-ng/mL级别灵敏度，有些甚至可以降至pg/mL级别，同时保持测量的线性、精确度和准确性。这种超乎寻常的灵敏度的获得，是在没有任何数据质量的牺牲或妥协的情况下实现的，正如在LLOQ下，观察到的极佳的精确度和准确性所证明的那样。总体而言，SCIEX Triple Quad 7500系统的所有功能结合在一起，使得本研究中所检测的一系列毒物的灵敏度得到了大幅提高。

引用文献

1. Enabling new levels of quantification - using the SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS System – QTRAP® Ready, powered by SCIEX OS Software. SCIEX Technical Note RUO-MKT-02-11886-A.
2. High Sensitivity and Dynamic Range for 93-Compound Forensic Panel Analysis in Urine. SCIEX Technical Note RUO-MKT-02-9914-A.

表1. 本工作流程中检测的49种毒物的统计结果。该表包括标准曲线范围、线性相关系数（R²值）和LLOQ，以及每种药物监测的两个MRM离子对在LLOQ浓度下的准确性精密度

化合物	标准曲线 (ng/mL)	线性相关 系数(R ²)	最低定量 下限 (ng/mL)	最低定量 下限准确性 (%)	最低定量下限 精密度 (%)
6-单乙酰吗啡 1, (6-MAM 1)	0.2-200	0.99191	0.2	82.62	2.74
6-单乙酰吗啡 2, (6-MAM 2)	0.2-200	0.9902	0.2	83.02	4.91
7-氨基氯硝西洋 1, (7-Aminoclonazepam 1)	0.5-100	0.9991	0.5	117.72	2.66
:7-氨基氯硝西洋 2, (7-Aminoclonazepam 2)	0.5-100	0.99936	0.5	112.71	7.54
7-羟基帽柱碱 1, (7-Hydroxymitragynine 1)	0.1-100	0.98891	0.1	84.76	1.72
7-羟基帽柱碱 2, (7-Hydroxymitragynine 2)	0.1-100	0.99006	0.1	90.58	4.33
乙酰基芬太尼 1, (Acetyl fentanyl 1)	0.02-50	0.98272	0.02	113.43	6.33
乙酰基芬太尼 2, (Acetyl fentanyl 2)	0.02-50	0.98393	0.02	112.01	9.49
A-羟基阿普唑仑 1, (Alpha-Hydroxyalprazolam 1)	1-100	0.99918	1	93.38	2.57
A-羟基阿普唑仑 2, (Alpha-Hydroxyalprazolam 2)	1-100	0.99817	1	93.67	7.67
阿普唑仑1, (Alprazolam 1)	0.01-100	0.9978	0.01	84.15	5.96
阿普唑仑2, (Alprazolam 2)	0.01-100	0.99741	0.01	80.98	1.33
安非他命1, (Amphetamine 1)	0.2-200	0.98925	0.2	117.13	22.79
安非他命2, (Amphetamine 2)	0.2-200	0.98784	0.2	86.02	8.95
苯甲酰爱康宁 1, (Benzoylecgonine 1)	0.5-100	0.9777	0.5	100	5.82
苯甲酰爱康宁 2, (Benzoylecgonine 2)	0.5-100	0.99776	0.5	103.7	3.07
丁丙诺啡1, (Buprenorphine 1)	0.4-400	0.99018	0.4	98.61	24.21
丁丙诺啡2, (Buprenorphine 2)	0.4-400	0.98312	0.4	96.09	5.49
肌安宁1, (Carisoprodol 1)	2-200	0.95267	2	95.22	13.59
肌安宁2, (Carisoprodol 2)	2-200	0.98049	2	117.4	12.85
可待因1, (Codeine 1)	0.01-50	0.99897	0.01	80.29	13.48

表1. 本工作流程中检测的49种毒物的统计结果。 该表包括标准曲线范围、线性相关系数（R²值）和LLOQ，以及每种药物监测的两个MRM离子对在LLOQ浓度下的准确性精密度（续）

化合物	标准曲线 (ng/mL)	线性相关 系数(R ²)	最低定量 下限 (ng/mL)	最低定量 下限准确性 (%)	最低定量下限 精密度 (%)
可待因2, (Codeine 2)	0.01-50	0.99904	0.01	93.47	17.8
右美沙芬1, (Dextromethorphan 1)	0.5-100	0.99598	0.5	119.17	10.95
右美沙芬2, (Dextromethorphan 2)	0.5-100	0.99772	0.5	101.42	5.86
安定1, (Diazepam 1)	0.5-100	0.99916	0.5	118.51	1.07
安定2, (Diazepam 2)	0.5-100	0.99522	0.5	118.3	0.96
双氢可待因的1, (Dihydrocodeine 1)	0.5-100	0.98889	0.5	98.4	5.04
双氢可待因的2, (Dihydrocodeine 2)	0.5-100	0.98006	0.5	117.31	4.45
EDDP 1 (美沙酮代谢物), (EDDP 1)	0.1-200	0.98973	0.1	90.93	8.74
EDDP 2 (美沙酮代谢物), (EDDP 2)	0.1-200	0.99128	0.1	109.63	13.35
芬太尼 1, (Fentanyl 1)	0.4-400	0.9821	0.4	112.74	3.66
芬太尼 2, (Fentanyl 2)	0.4-400	0.98615	0.4	110.68	2.3
加巴喷丁 1, (Gabapentin 1)	2-200	0.98159	2	115.14	5.53
加巴喷丁 2, (Gabapentin 2)	2-200	0.98326	2	113.6	3.94
氢可酮 1, (Hydrocodone 1)	1-100	0.97652	1	99.3	5.59
氢可酮 2, (Hydrocodone 2)	1-100	0.9907	1	103.96	7.82
氢吗啡酮 1, (Hydromorphone 1)	1-100	0.98541	1	110.69	0.35
氢吗啡酮 2, (Hydromorphone 2)	1-100	0.98618	1	97.29	1.25
氯羟去甲安定 1, (Lorazepam 1)	0.5-100	0.99699	0.5	0.6.76	2.89
氯羟去甲安定 2, (Lorazepam 2)	0.5-100	0.9968	0.5	119.49	5.71
3,4-亚甲二氧基苯丙胺 1, (MDA 1)	10-100	0.92279	10	109.46	19.09
3,4-亚甲二氧基苯丙胺 2, (MDA 2)	10-100	0.99617	10	108.54	10.94
甲基二乙醇胺 1, (MDEA 1)	2-200	0.99567	2	100	7.62
甲基二乙醇胺 2, (MDEA 2)	2-200	0.99682	2	100	5.95
3,4 - 亚甲基二氧甲基苯丙胺 1, (MDMA 1)	5-200	0.9855	5	108.39	1.94
3,4 - 亚甲基二氧甲基苯丙胺 2, (MDMA 2)	5-200	0.99562	5	102.96	5.53
美沙酮 1, (Methadone 1)	1-100	0.9904	1	97.53	4.64
美沙酮 2, (Methadone 2)	1-100	0.9933	1	115.54	5.37
甲基苯丙胺 1, (Methamphetamine 1)	2-200	0.99361	2	112.1	324
甲基苯丙胺 2, (Methamphetamine 2)	2-200	0.9955	2	105.7	1.71
哌醋甲酯 1, (Methylphenidate 1)	1-100	0.99276	1	96.82	0.65
哌醋甲酯 2, (Methylphenidate 2)	1-100	0.98423	1	87.52	4.34
咪达唑仑 1, (Midazolam 1)	1-100	0.99861	1	92.81	3.91

表1. 本工作流程中检测的49种毒物的统计结果。 该表包括标准曲线范围、线性相关系数（R²值）和LLOQ，以及每种药物监测的两个MRM离子对在LLOQ浓度下的准确性精密密度（续）

化合物	标准曲线 (ng/mL)	线性相关 系数(R ²)	最低定量 下限 (ng/mL)	最低定量 下限准确性 (%)	最低定量下限 精密密度 (%)
咪达唑仑 2, (Midazolam 2)	1-100	0.99484	1	114.07	3.21
帽柱木碱 1, (Mitragynine 1)	0.2-200	0.99572	0.2	97.85	16.06
帽柱木碱 2, (Mitragynine 2)	0.2-200	0.99422	0.2	96.69	6.71
吗啡 1, (Morphine 1)	1-100	0.98897	0.2	116.82	0.73
吗啡 2, (Morphine 2)	1-100	0.9883	0.2	116.5	1.46
纳洛酮 1, (Naloxone 1)	1-100	0.98323	1	100.71	0.9
纳洛酮 2, (Naloxone 2)	1-100	0.98563	1	97.88	4.11
环丙甲羟二羟吗啡酮 1, (Naltrexone 1)	0.5-100	0.99273	0.5	119.45	4.17
环丙甲羟二羟吗啡酮 2, (Naltrexone 2)	0.5-100	0.98868	0.5	119.72	18.77
去丁丙诺啡 1, (Norbuprenorphine 1)	0.4-200	0.97745	0.4	98.35	4.73
去丁丙诺啡 2, (Norbuprenorphine 2)	0.4-200	0.9792	0.4	98.05	0.5
去甲可待因 1, (Norcodeine 1)	0.5-100	0.98892	0.5	119.46	2.73
去甲可待因 2, (Norcodeine 2)	0.5-100	0.9903	0.5	117.3	1.03
去甲西洋 1, (Nordiazepam 1)	1-100	0.99073	1	107.85	0.48
去甲西洋 2, (Nordiazepam 2)	1-100	0.99087	1	107.46	1.11
诺芬太尼 1, (Norfentanyl 1)	0.4-100	0.99366	0.4	100.28	4.03
诺芬太尼 2, (Norfentanyl 2)	0.4-100	0.99601	0.4	99.91	4.13
去氢可待因 1, (Norhydrocodone 1)	1-100	0.98777	1	93.83	6.16
去氢可待因 2, (Norhydrocodone 2)	1-100	0.99486	1	94.06	7.91
诺罗西酮 1, (Noroxycodone 1)	0.5-100	0.99411	0.5	110.52	5.61
诺罗西酮 2, (Noroxycodone 2)	0.5-100	0.99235	0.5	112.35	5.62
去甲丙氧吩 1, (Norpropoxyphene 1)	1-200	0.97989	1	105.35	9.6
去甲丙氧吩 2, (Norpropoxyphene 2)	1-200	0.98323	1	104.65	10.7
O-去甲基曲马多 1, (O-Desmethyltramadol 1)	1-100	0.9631	1	93.34	13.91
O-去甲基曲马多 2, (O-Desmethyltramadol 2)	1-100	0.96164	1	90.77	4.82
去甲羟基安定 1, (Oxazepam 1)	0.5-100	0.99704	0.5	85.31	7.74
去甲羟基安定 2, (Oxazepam 2)	0.5-100	0.99195	0.5	86.37	14.15
羟考酮 1, (Oxycodone 1)	0.5-100	0.98486	0.5	113.73	11.84
羟考酮 2, (Oxycodone 2)	0.5-100	0.98492	0.5	115.65	10.38
羟吗啡酮 1, (Oxymorphone 1)	1-100	0.98986	0.5	114.44	2.78
羟吗啡酮 2, (Oxymorphone 2)	1-100	0.99246	0.5	116.2	1.98
苯环己哌啶 1, (PCP 1)	0.5-100	0.99167	0.5	103.36	10.99

表1. 本工作流程中检测的49种毒物的统计结果。该表包括标准曲线范围、线性相关系数（R²值）和LLOQ，以及每种药物监测的两个MRM离子对在LLOQ浓度下的准确性精密度（续）

化合物	标准曲线 (ng/mL)	线性相关 系数(R ²)	最低定量 下限 (ng/mL)	最低定量 下限准确性 (%)	最低定量下限 精密度 (%)
苯环己哌啶 2, (PCP 2)	0-100	0.98672	0.5	92.84	14.21
普瑞巴林 1, (Pregabalin 1)	1-200	0.9838	1	94.53	16.48
普瑞巴林 2, (Pregabalin 2)	1-200	0.98277	1	94.79	16.12
他喷他多 1, (Tapentadol 1)	0.5-100	0.98018	0.5	94.01	13.36
他喷他多 2, (Tapentadol 2)	0.5-100	0.9981	0.5	103.41	7.72
羟基安定 1, (Temazepam 1)	0.05-100	0.99217	0.05	113.97	4.89
羟基安定 2, (Temazepam 2)	0.05-100	0.99249	0.05	119.15	4.38
曲马多 1, (Tramadol 1)	0.5-100	0.99674	0.5	102.19	10.33
曲马多 2, (Tramadol 2)	0.5-100	0.99779	0.5	110.82	3.63
唑吡坦 1, (Zolpidem 1)	1-100	0.98577	1	93.87	4.83
唑吡坦 2, (Zolpidem 2)	1-100	0.9981	1	103.41	7.81
9-羧基-四氢大麻酚 1, (THC-COOH 1)	1-100	0.9537	1	116.92	5.86
9-羧基-四氢大麻酚 2, (THC-COOH 2)	1-100	0.9846	1	118.37	7.68

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11427-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390

全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333

官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835

官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)