

使用ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD系统进行法医毒理学筛查

Mark Roberts and Michelle Wood

沃特世公司MS技术中心（英国曼彻斯特）

应用优势

利用最新的仪器平台和两种互补方法实现更全面的毒物筛查。ACQUITY UPLC® I-Class系统和Xevo® TQD MS:

- 一种具备出色灵敏度和选择性的目标性MRM方法，可利用每种化合物的两个离子对筛选178种重要待测物
- 一种包含超过950种毒物谱库的全扫描MS方法，用户可以方便地在谱库中添加数据

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC I-Class系统

Xevo TQD质谱仪

RADAR™技术

PIC® 扫描

ACQUITY UPLC HSS C₁₈色谱柱

Waters® 全回收样品瓶

关键词

法医毒理学，靶向分析，非靶向筛查，有毒物质，UPLC®/MS/MS

简介

法医毒理学实验室需要采用大范围筛查技术来检出高度复杂生物基质中的有毒物质，如活体样本和尸检样本等。先前有两种可供选择的毒理学筛查方法被开发出来，这两种方法均采用了ACQUITY UPLC系统和ACQUITY® TQD¹⁻³。这两种互补的方法让用户可以充分利用全扫描数据的采集优势和目标性MRM筛查方法的高灵敏度⁴。

这些方法已成功应用在世界各地超过100间的实验室，包括此前基本或完全没有LC/MS经验的实验室。随着新一代仪器的出现提供了更好的功能和性能，人们开始关注如何将这些强大而成熟的筛查方法应用到新的系统中。本应用纪要初步评价了现有的两种筛查方法对于ACQUITY UPLC I-Class系统和Xevo TQD质谱仪的适用性。

本研究的目标是评价ACQUITY UPLC I-Class系统和Xevo TQD在法医毒理学筛查中的实用性，以及评估现有色谱方法结合现有全扫描MS和MRM方法¹⁻³在这一新平台上的适用性。

实验

样品描述

药物标准品购自Sigma-Aldrich®（英国多塞特郡普尔）和LGC Standards（英国萨里郡特丁顿），均为固体化学品或浓度为1 mg/mL的经过认证的溶液。甲酸铵和甲酸购自Sigma-Aldrich。乙腈购自Greyhound Chromatography（英国伯肯黑德）。用于例行筛查的真实尿液样品来自于合作者。

将真实尿液样品进行液-液萃取并转移至沃特世全回收样品瓶。将提取物注入ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD和ACQUITY UPLC/TQD中。

UPLC条件

系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ 2.1 × 150 mm, 1.8 μm 部件号186003534
柱温:	50 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	5 μL (MRM) 或 10 μL (全扫描)
洗针溶剂:	5 mM甲酸铵, pH 3.0
清除溶剂:	5 mM甲酸铵, pH 3.0
流速:	400 μL/min
流动相A:	5 mM甲酸铵, pH 3.0
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度:	流动相B从13%增加至 95%, 分析时间为15分钟

以上条件与此前ACQUITY UPLC系统所用条件相同^{1,2}。

MS条件

质谱仪:	Xevo TQD
电离模式:	ESI+ (全扫描模式为ESI-)
毛细管电压:	3.0 kV
锥孔电压:	根据方法而异
碰撞能量:	根据方法而异
脱溶剂气温度:	400 °C
脱溶剂气:	800 L/h
锥孔气:	20 L/h
采集模式:	多反应监测 (MRM) 或 全扫描MS
数据管理:	MassLynx®, 结合 TargetLynx™和ChromaLynx™ 应用软件

以上条件与此前ACQUITY TQD所用条件相同^{1,2}。

技术创新

图1所示为配备Flow-Through Needle (FTN)⁵设计的ACQUITY UPLC I-Class系统，可确保样品只与进样针和通向UPLC色谱柱的流路接触。样品无需转移至定量环，从而最大程度地减少样本残留并提高结果可信度。此外，系统体积减小至100 μ L，降低了分析物扩散并使峰形得到改善。系统对色谱柱加热器也进行了改进，利用主动预加热器减少梯度延迟和柱外谱带展宽。

如图1所示，最新的Xevo TQD⁶附带了非常有利于法医分析的功能，例如RADAR和PICs。RADAR可在采集全扫描信息的同时执行MRM分析，这是一种非常有用的方法开发和故障排除工具。借助产物离子确认扫描（PICs），可以在检出特定MRM峰时自动触发产物离子扫描。这让分析员可以查看更多确证数据，改善化合物鉴定结果。



图1. 配备Xevo TQD质谱仪的ACQUITY UPLC I-Class系统。

结果与讨论

MRM和全扫描MS技术概述

原有MRM方法筛查出178种常见毒物。将采集方法应用到色谱洗脱范围内的30个时间窗口中，以提高数据采集的效率，并确保数据点数量足以进行峰表征。对每个MRM时间窗口进行配置，使时间窗口于第一个化物流出之前0.5分钟开始，并于最后一个化物流出之后0.5分钟结束。因此，本研究的一个关键要素是保留时间（RT）可转换性的评估，并评估原有MRM时间窗口是否仍适用于ACQUITY UPLC I-Class系统。

原有全扫描MS方法通过在7个不同锥孔电压（+20V、+35 V、+50 V、+65 V、+80 V、+95 V和-20 V）下采集到的数据生成一组全面的质谱数据。ChromaLynx应用软件自动将这些数据与包含950种物质的谱库进行比较。

在本研究中，ChromaLynx用于将新MS系统采集的谱图数据与原有的ACQUITY TQD谱库中的谱图进行比较。

使用MRM和全扫描采集模式进行系统适应性混合标准品进样

在采集真实样本数据之前进行分析系统性能验证是一个良好的实验室操作习惯。这一验证过程通常通过注入系统适应性混合物（SSM）来完成，该混合物由在整个色谱梯度范围内洗脱的多种物质组合而成。

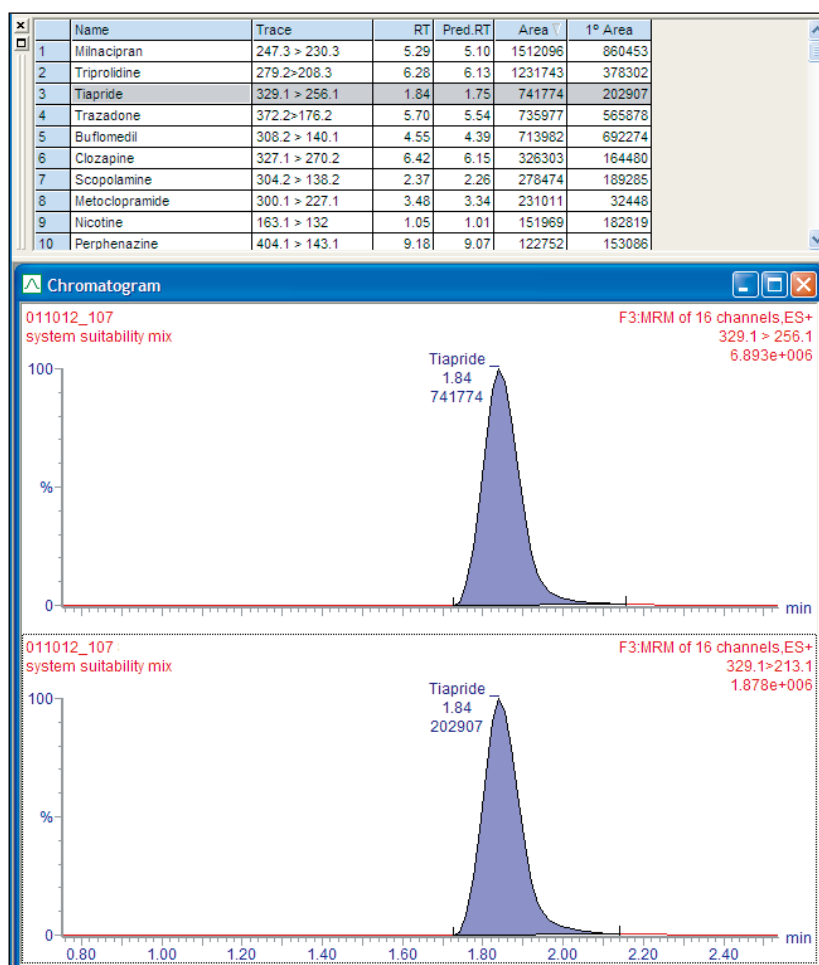


图2. TargetLynx浏览器显示了使用ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD对SSM进行目标性MRM筛查后的典型结果图。检出全部10种组分的RT值均在预期RT的0.3分钟误差范围内，并完全落在原有MRM时间窗口内。这表明该色谱方法已经成功地转换到ACQUITY UPLC I-Class系统中。

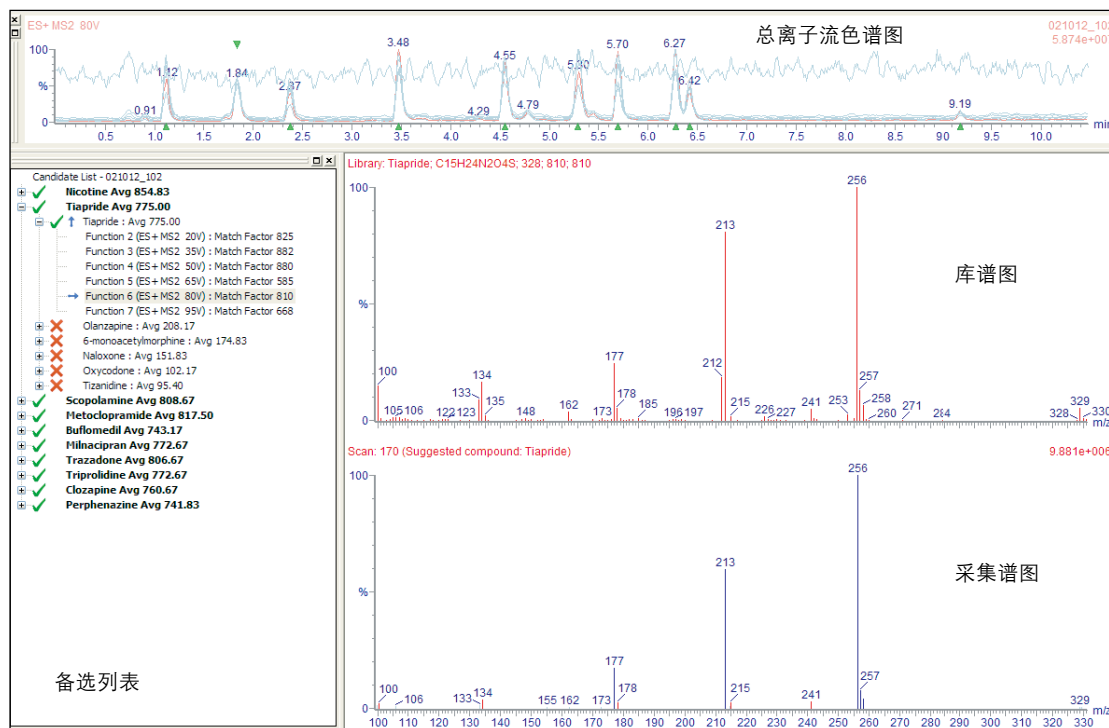


图3. ChromaLynx浏览器显示了SSM全扫描筛查分析结果。全部10种组分均被检出，并且每一种都具有较高的平均 (Avg) 匹配因子，表明其与现有谱库之间的一致性。

通过目标性MRM筛查分析真实尿液样品

所提交尿液样品的常规法医毒理学筛查结果如表1所示。所有确认物质的RT均在预期RT的0.19分钟误差范围内，这再一次证明了现有色谱方法可以很好地应用到ACQUITY UPLC I-Class系统中。

对生物样本进行药物代谢物鉴定是非常有利的，理由如下：它们能用于延长药物检测窗口期，对药物摄入提供进一步确证并有助于数据解析。在此样品中，两个系统均鉴定出美沙酮及其代谢物EDDP、可卡因及其代谢物苯甲酰芽子碱。图4显示了由TargetLynx浏览器列出的ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD MRM分析结果的详细信息。新的系统配置检出了一些额外物质，这意味着灵敏度得到了提高。在新的配置下获得的峰面积几乎都大于ACQUITY UPLC/TQD所得的峰面积，同样也证明了灵敏度的提升。ACQUITY UPLC I-Class FTN所具备的最小化峰扩散和最大化峰响应功能可能是获得以上理想结果的原因。

化合物名称	预期RT	ACQUITY UPLC/TQD (原始配置)		ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD (新配置)	
		实际RT	峰面积	实际RT	峰面积
美沙酮	8.61	8.77	434734	8.80	463948
EDDP	7.46	7.67	145310	7.65	149118
扑热息痛	1.50	1.58	5703	1.55	55966
可卡因	4.61	4.80	11644	4.75	11702
苯甲酰芽子碱	2.97	3.13	10500	3.09	11261
尼古丁	1.01	1.02	3284	1.05	6143
咖啡因	2.10	2.19	1499	2.16	3866
替马西泮	9.34	—	—	9.46	3683
奥沙西泮	8.07	8.17	1853	8.18	2528
茶碱	1.46	—	—	1.45	2255
去甲地西洋	9.14	—	—	9.31	1297

表1. 使用原有仪器配置和新仪器配置对真实尿液样品进行目标性MRM筛查的分析结果。

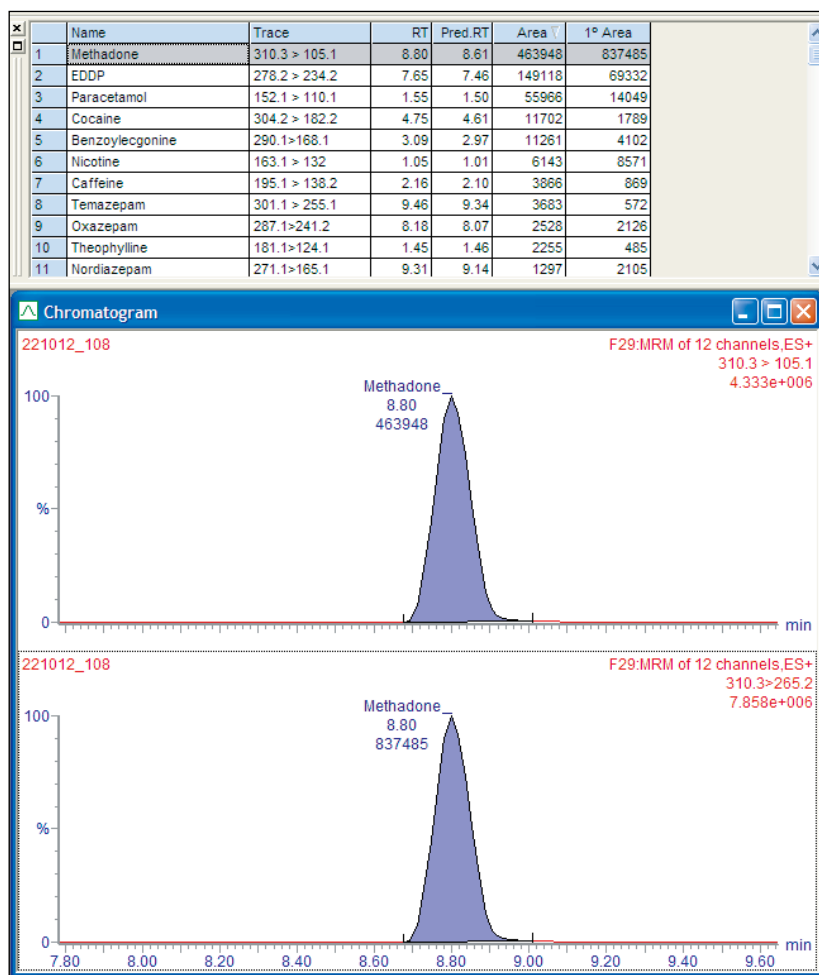


图4. TargetLynx浏览器显示了从尿液样品提取物中检出美沙酮的处理结果。

利用全扫描MS分析毒理学尿液真实样品

全扫描MS方法的一个主要优点是可以同时筛选大量物质（仅受谱库大小限制）。这与仅限于一组分析物的目标性MRM方法恰好相反。现在，沃特世公司提供了一个由超过950种物质构成的谱图数据库。用户可以非常方便地对这个库进行扩充。使用ChromaLynx应用软件还可以创建新的谱库和搜索多个谱库。这种方法的另一个优点是数据不受限于采集通道的设定，因此它可以为回顾性分析提供完整的数据集。

图5显示了在新系统上使用全扫描MS方法对另一个尿液样品进行筛查的结果。在此样品中检出了代谢物N-去甲基米氮平及原型米氮平。ChromaLynx浏览器中的谱图窗口清晰地显示出，N-去甲基米氮平的碎片离子与之前使用ACQUITY TQD采集的谱图匹配良好。这表明通过ACQUITY TQD得到的现有谱图库可以用于新的Xevo TQD。

全扫描MS方法还检出了另一种化合物赛洛唑啉。利用目标性MRM方法无法鉴定这种抗鼻充血剂，因为目标组目前尚未包含该物质。

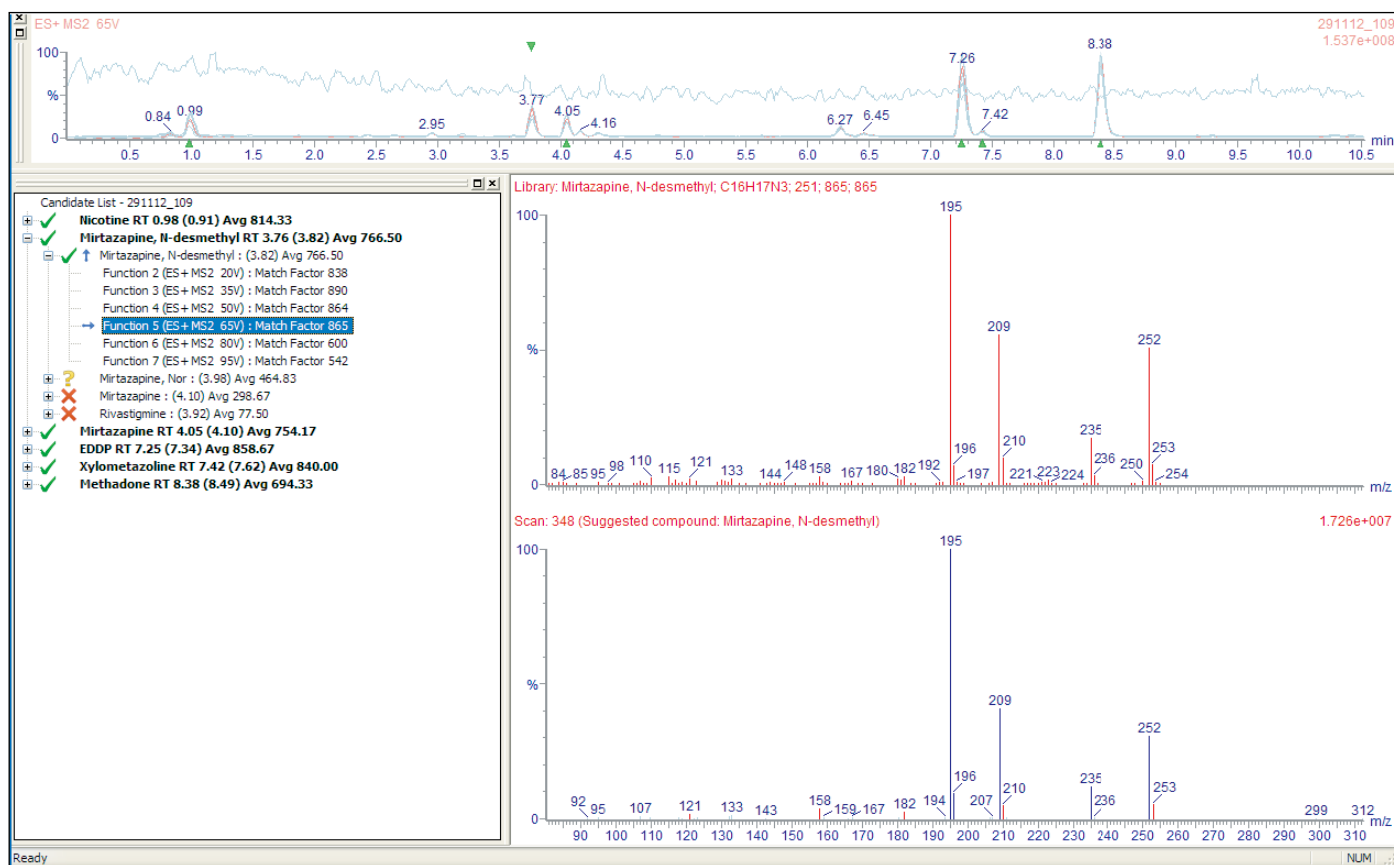


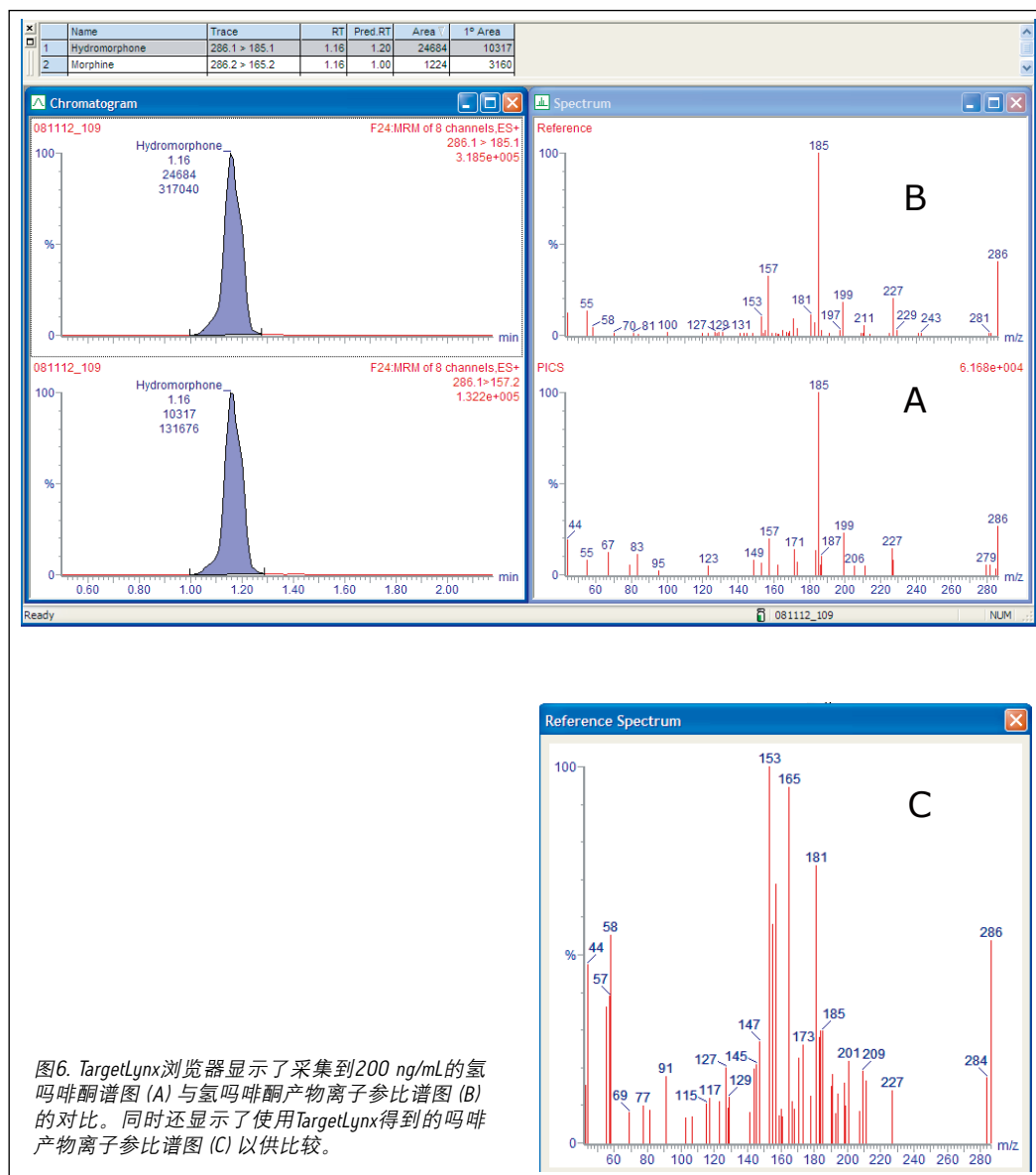
图5. TargetLynx浏览器显示了从尿液样品提取物中检出的米氮平N-去甲基代谢物的结果。

使用PIC鉴别氢吗啡酮和吗啡

新Xevo TQD的一个非常实用的功能是在MRM数据采集期间触发数据引导的产物离子确认扫描(PICs)功能。根据母离子到碎片离子的裂解模式，可以对极其类似的化合物进行区分。

图6为使用MRM筛查方法对氢吗啡酮进行分析后取得的数据。两个MRM通道同时获得了氢吗啡酮和吗啡的响应。这个结果并不让人意外，因为这两种物质是共享几个MRM通道的同分异构体。此外，使用本应用纪要中介绍的色谱方法，它们的洗脱时间相互只相差不到0.2分钟。但是，PIC扫描生成的数据可以提供更多信息，有助于对相似物质进行区分。

在此示例中，PICs数据与此前保存的氢吗啡酮参比谱图的匹配程度高于吗啡参比谱图。分析员可以在TargetLynx方法中选择两个参比谱图，从而便于直观的谱图比较。



使用RADAR识别其它分析物

尿液样品经过全扫描MS分析后，还通过采用RADAR的MRM目标性筛查方法进行了分析。这样可以在执行传统MRM分析的同时采集全扫描数据，并找出如果未包含在MRM方法中时可能会错过的峰。图7显示了通过这种分析方法获得的全扫描数据和一些同步采集得到的MRM数据。代谢物N-去甲基米氮平、去甲西酞普兰和药物赛洛唑啉的全扫描峰分别在3.79、6.47和7.42分钟时可以清晰地看到。但是，由于这些物质尚未包含在此目标性MRM的检测方法中，故无法通过MRM方法检出。图8显示了在锥孔电压为30V时采集到的两个代谢物峰的质谱图。这些额外的信息可能会非常有用，特别是对于复杂的生物样本，因为它们可以指示通常在目标性筛查方法中无法检出的未知组分的存在。此外，它们还可以用于识别和解决共流出化合物的相关问题，这对于方法开发和验证期间的故障排除也是非常重要的工具。

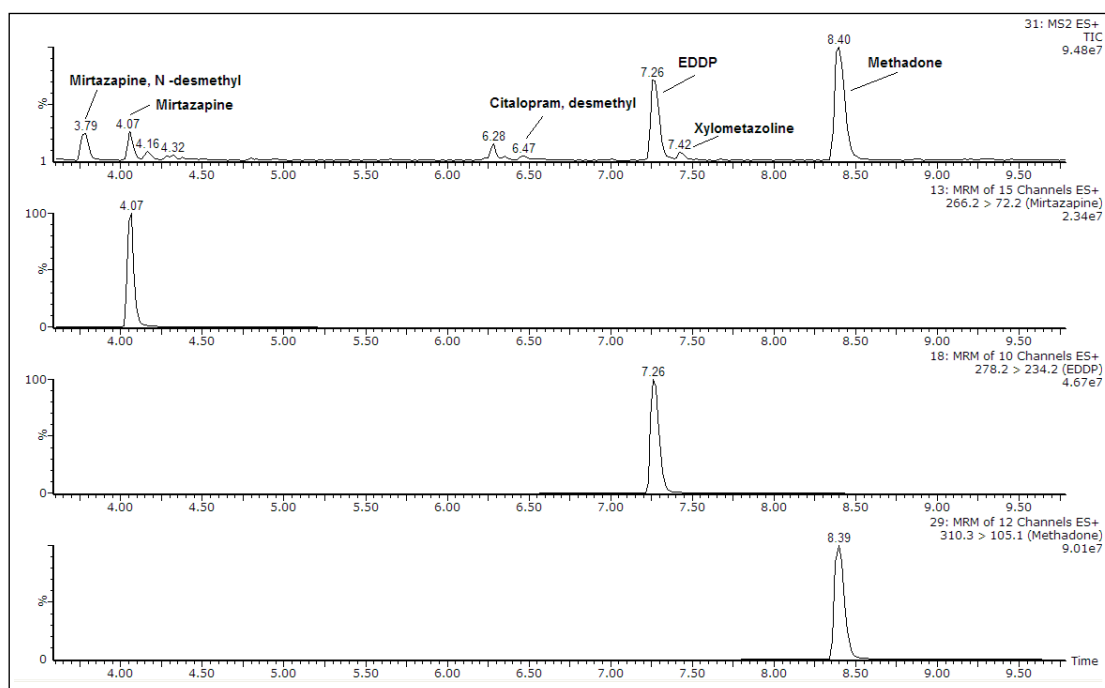


图7. 使用RADAR与MRM数据同步采集的尿液水解样品全扫描数据 (A)。3.79分钟的全扫描峰为N-去甲基米氮平，6.47分钟为去甲西酞普兰，7.42分钟为赛洛唑啉，这些化合物目前尚未包含在此目标性MRM方法中。

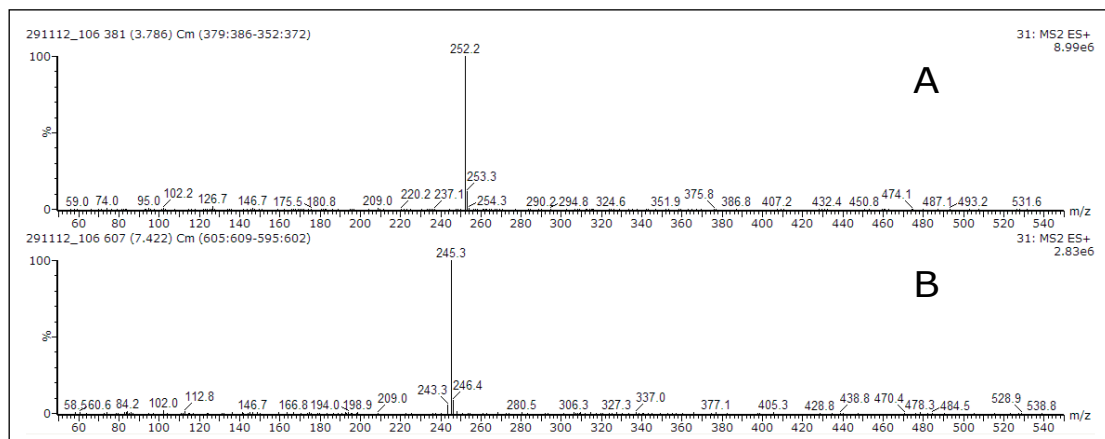


图8. 在RADAR模式下收集到的N-去甲基米氮平在3.79分钟 (A)、赛洛唑啉在7.42分钟 (B) 的全扫描质谱图 (锥孔电压为30V)。

结论

将毒理学筛查方法成功地转换到新一代UPLC/MS系统中能让法医分析员在实验室接触到最新的分析工具。ACQUITY UPLC I-Class系统的峰扩展更低，系统体积也更小，从而提高了检测中MS的灵敏度。Xevo TQD结合了RADAR和PICs等新功能，可以为分析员提供更加丰富的信息。

此外还提供有初始设置，其中包含了采集和处理数据的所有必需方法。预配置的方法涵盖了大量的常见毒物，只需最少的用户干预即可在实验室实施。

这些方法可完全自定义，也可以方便地进行修改，以满足科学家的不同需要。例如，可以向数据库添加其他化合物。这确保了这些方法的通用性，并保证它们在未来也能保持实用性。

实验室在应用本方法之前，用户有必要对方法进行一次的完整的验证。

参考文献

1. Roberts M, Lee R, Wood M. Targeted MRM Screening for Toxicants in Biological Samples by UPLC/MS/MS. Waters Application Note 720002749EN.
2. Lee R, Roberts M, Paccou A, Wood M..Development of a New UPLC/MS Method for Systematic Toxicological Analysis. Waters Application Note 72002905EN.
3. Humbert L, Grisel F, Richeval C, Lhermitte M. Screening of Xenobiotics by Ultra-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Using In-Source Fragmentation at Increasing Cone Voltages: Library Constitution and an Evaluation of Spectral Stability. *Journal of Analytical Toxicology*. 2010; Vol. 34.
4. Rosano TG, Wood M, Swift TA. Postmortem Drug Screening by Non-Targeted and Targeted UltraPerformance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technology. *Journal of Analytical Toxicology*. 2011; Vol. 35.
5. ACQUITY UPLC I-Class System Brochure. Waters Brochure 720003290EN.
6. Xevo TQD Brochure. Waters Brochure 720003953EN.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, ACQUITY, UPLC, PIC, Xevo和MassLynx是沃特世公司的注册商标。RADAR, TargetLynx, ChromaLynx和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 年沃特世公司。印制于中国。2013年2月 720004602ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com