

DART-Orbitrap MS 快速筛查血液中的 130 种毒物

孙雨安 王珂 李振兴 于文浩 王国庆

(郑州轻工业学院 材料与化学工程学院, 郑州 450001)

摘要: 血液样品经乙酸乙酯提取、离心、取上清液 5 μL 筛网进样, 采用正离子模式扫描进行实时直接分析离子源-静电场轨道阱高分辨质谱(DART-Orbitrap MS)分析, 通过比对 130 种毒物精确分子质量数据库, 建立了血液中毒物快速筛查分析方法. 结果表明: 130 种毒物的检出限(以 3 倍 S/N 计算)为 0.2~50 $\mu\text{g/L}$, 质量精确度均在 5×10^{-6} μg 以内. 该方法样品前处理简单、溶剂消耗少, 具有分析时间短、灵敏度高的特点, 适用于血液中毒物的快速筛查分析.

关键词: 实时直接分析(DART); 静电场轨道阱高分辨质谱; 筛查; 血液; 毒物

中图分类号: O657.63; R991

文献标志码: A

毒物是指能够对生物体产生损害或异常物质的小剂量外源化学物质. 近年来, 毒品吸食和中毒等各种案件层出不穷, 案件涉及化合物广泛、检材种类繁多. 同时, 案件侦破的准确性与侦破速度要求有力的方法作支持, 因此建立快速、准确、广泛且行之有效的毒物筛查方法具有十分重要的意义. 已报道的血液中毒物的检测方法有气相色谱法、气相色谱-质谱联用法^[1]、液相色谱-质谱联用法^[2-3]等. 色谱法要求对样品进行严格的提取、净化、浓缩等预处理步骤来避免检测中出现的基质干扰、假阳性等问题, 同时目标物在色谱柱中的分离也需要一定的时间, 这些过程不能满足准确、快速的筛查要求.

2005 年, Cody, R. B. 等^[4]首次报道了实时直接分析离子源(DART). 这种离子源具有直接、快速、不需要样品预处理或简单的预处理等特点, 可以实现高通量的样品检测和筛查分析, 被应用于食品药品非法添加及残留^[5-6]、司法鉴定^[7]、成分分析^[8-10]等各个研究领域. 静电场轨道阱高分辨质谱(Orbitrap-MS)技术在其扫描质量范围内可提供目标化合物的精确质量数, 且具有质量分辨率高、灵敏度高、数据库建立和软件检索方便等优点, 在筛查定性分析中具有广泛的前景^[11-12].

现拟采用实时直接分析离子源-静电场轨道阱高分辨质谱(DART-Orbitrap MS)技术, 以液-液萃取法为前处理手段, 结合基于精确分子质量的自动筛选软件 ToxID, 以期建立血液中 130 种毒物的快速筛查分析方法.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

静电场轨道阱高分辨质谱仪(Exactive Orbitrap MS, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DART 实时直接分析离子源(美国 Ion Sense 公司); 高速台式离心机(TGL-16, 上海医用分析仪器厂); 涡旋混合器(MS 3 basic, 德国 IKA 公司); 移液器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司).

NaOH、乙酸乙酯、甲醇(均为 AR, 天津市凯通化学试剂有限公司); 甲醇和乙腈(HPLC 纯, 美国 J. T. Baker 公司); 130 种标准品来自中国药品生物制品检定所和德国 Dr. Ehrenstorfer 公司.

标准溶液配制: 分别精确称取上述标准物质, 甲醇溶解、定容配制成 1.0 g/L 的单标储备液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

收稿日期: 2014-03-20; 修回日期: 2015-04-25.

基金项目: 国家自然科学基金(21075113; 21171150).

作者简介(通信作者): 孙雨安(1964-), 男, 河南郑州人, 郑州轻工业学院教授, 主要研究方向: 色谱分析; E-mail: sya371@163.com.

使用前将上述单标储备液用甲醇逐级稀释至所需浓度的单标工作液和混标工作液。

1.2 质谱条件

离子源(DART)条件:离子化气:氦气;正离子模式;筛网模块进样;样品传输速度:0.4 mm/s;离子化温度 400 °C;栅极电压 250 V;离子源出口距离质谱进口 1 cm。

Exactive 质谱条件:正离子扫描模式(m/z 50 ~ m/z 600);反吹气流量 0, Tube lens 电压 60 V, Skimmer 电压 22 V, 自动增益控制(AGC) 250 ms, 分辨率 50,000。

1.3 样品前处理

取 125 μ L 血液于 1 mL 的 EP 管中,加入 375 μ L 乙酸乙酯溶液,涡旋混匀,8000 r/min 离心 2 min,上清液待测。

1.4 基于精确相对分子质量的数据库的建立

建立 130 种毒物的基于精确相对分子质量的数据库,数据库同时包含化合物的名称、化学式等信息。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

2.1.1 DART 的参数优化

选取样品传输速度、离子化温度、栅极电压、离子源出口与质谱进口距离 4 个影响 DART 源离子化效率的主要因素为均匀设计的实验因素。同时考虑各因素水平的重复试验,采用均匀设计试验对所选因素进行优化(表 1)。

表 1 因素水平表

实验序号	距离/cm	温度/°C	速度/(mm·s ⁻¹)	电压/V
1	1.0	250	0.8	300
2	1.0	400	0.4	250
3	1.0	250	1.5	150
4	1.5	400	0.6	100
5	1.5	200	0.2	350
6	1.5	350	1.0	250
7	2.0	200	0.4	200
8	2.0	350	1.5	100
9	2.0	150	0.8	350
10	2.5	300	0.2	300
11	2.5	150	1.0	200
12	2.5	300	0.6	150

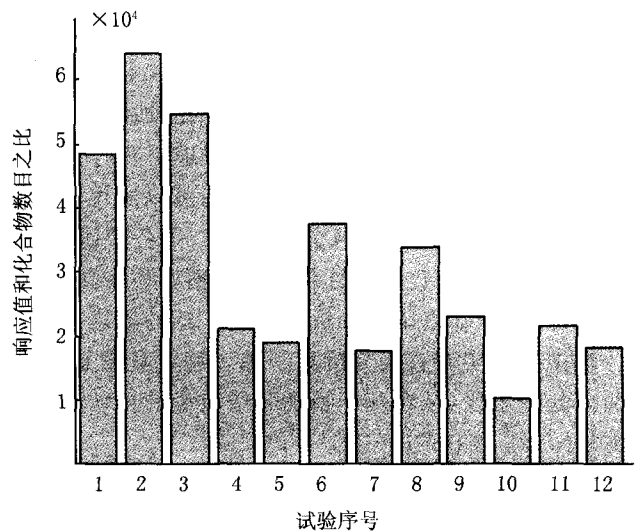


图 1 均匀设计中各次实验的响应情况 (500 ng/mL 混合标准溶液)

通过对均匀设计的直观分析(图 1)可以发现,以检测的化合物响应值与化合物数目之比为标准,选取第 2 组试验的试验条件作为 DART 源的最优

条件。实验表明,4 种因素对试验结果的影响有主到次依次为:离子源出口与质谱进口的距离、样品传输速度、离子化温度、栅极电压,其中离子源出口与质谱进口距离是影响实验结果的最重要因素。增加两者的距离各化合物的响应有显著的下降,但考虑样品传输和污染的问题不宜太近。在 1 cm 和 1.5 cm 时,其对化合物的检出数目的影响相当,但对化合物的响应影响较为明显。样品传输速度的增加有利于物质响应但不宜超过 1 mm/s。最终确定样品传输速度:0.4 mm/s、离子化温度 400 °C、栅极电压 250 V、离子源出口距离质谱进口 1 cm 作为 DART 离子源的最优参数。

2.2 样品预处理方法的优化

对血液样品的预处理方法有液-液萃取法、固相萃取法、基质分散固相萃取法、沉淀蛋白法以及衍生化的方法^[13-16]。其中固相萃取法及衍生化的方法耗时较长,较难达到快速筛查的要求^[17],所以实验采用液-液萃取和沉淀蛋白的方法。考虑吗啡类和苯丙胺类等药物的性质,血液样品中的吗啡类和苯丙胺类药物在碱性的条件下提取率较高。采用氢氧化钠(0.1 mol/L)溶液作为碱化试剂,用乙酸乙酯进行液-液萃取和乙腈

沉淀蛋白作对比.结果表明,纯溶剂组(图2(a)和(c))的实验效果要明显优于加入碱化试剂的实验组(图2(b)和(d)),弱碱性的毒物添加碱化试剂可以使目标化合物游离出来,对弱碱性毒物的提取有利,但碱化后血液中的杂质也会被萃取出来产生干扰,影响测定的准确性,不利于多种类毒物的筛查.图2(a),(b),(c),(d)(m/z 300-400)对应的目标毒物的检出数目分别为41种、14种、21种、10种.采用乙酸乙酯提取的效果最好,提取的化合物的数目最多,且谱图较为干净,物质的灵敏度高(见图2).实验考察了分别添加1.5倍、3倍、4.5倍样品体积的提取剂进行液-液萃取.结果表明,加入的乙酸乙酯过多容易将基质中的内源性物质提取出来,谱图复杂,不利于对筛查结果的确认.加入的乙酸乙酯较少,对目标化合物的提取不完全,提取率较低.实验最终选用乙酸乙酯作为提取剂,提取剂的加入量为样品体积的3倍.

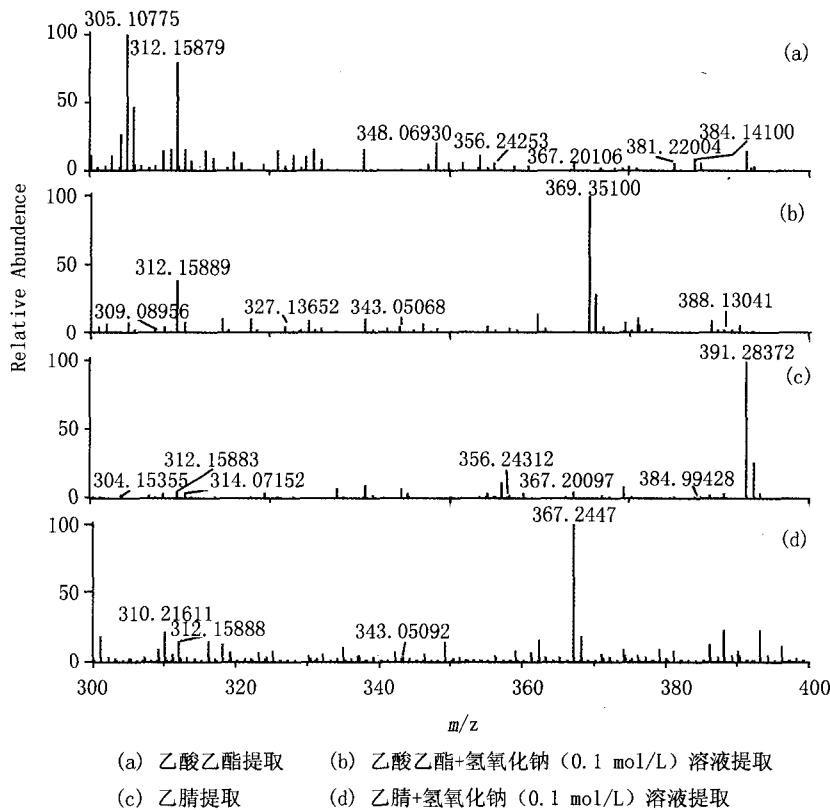


图2 4种预处理方法的比较 (m/z 300 - 400)

2.3 定性过程

50 $\mu\text{g/L}$ 的基质加标情况下,栅极电压为正时,大部分的加标物质的离子化形式为 $[M+H]^+$,少量的出现了 $[M+NH_4]^+$ 和 $[M+H_3O]^+$ 形式.采用高分辨质谱结合全自动筛查软件ToxID 2.1.2进行筛选,设定筛查的质量精确度为 5×10^{-6} μg 以内.试验结果表明,90%的毒物的质量精度在 1×10^{-6} μg 以下,130种毒物质量精确度均在 5×10^{-6} μg 以内,符合高分辨质谱的定性要求.

2.4 检出限

在空白血样中加入混标溶液,以3倍信噪比(S/N)的响应值对应的基质加标浓度作为检出限(LOD),10倍信噪比作为方法的定量限(LOQ).50 $\mu\text{g/L}$ 浓度下的基质加标样品的检出限和定量限的结果如表2所示.

3 结论

建立了血液中130种毒物的实时直接分析离子源-静电场轨道阱高分辨质谱(DART-Orbitrap MS)快速筛选数据库和方法.筛查数据库的扩充和样品的处理简单,适用于目前以定性为目的的血液中毒物的快速筛查工作,为毒物分析工作提供一定的参考依据.

表2 130种毒物的检出限(LOD)和定量限(LOQ)

毒物名称	LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	毒物名称	LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	毒物名称	LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
3-羟基克百威	1.3	4.2	甲氟磷	3.3	11	螺虫乙酯	4.9	16
MDMA	0.6	2.0	甲基苯丙胺	0.2	0.8	氯胺酮	0.2	0.6
O3-单乙酰吗啡	2.7	9.1	甲基嘧啶磷	0.3	1.2	杀虫环	18	62
O6-单乙酰吗啡	2.7	9.1	甲基异柳磷	1.7	5.7	杀虫脒	0.4	1.2
阿苯达唑	4.9	16	甲萘威	1.7	5.8	杀虫脒	8.2	27
阿普唑仑	4.7	15	甲氰菊酯	2.8	9.2	杀螟丹	1.0	3.2
艾司唑仑	11	37	甲霜灵	0.7	2.3	杀扑磷	1.7	5.8
安定	1.3	4.5	腈菌唑	2.0	6.8	杀线威	2.2	7.4
氨基比林	1.1	3.7	精吡氟禾草灵	1.8	6.0	双苯三唑醇	8.4	27
倍硫磷	1.2	4.1	精甲霜灵	0.6	2.0	双苯酰草胺	0.3	1.2
倍硫磷亚砷	2.2	7.3	久效磷	1.9	6.3	霜霉威	0.2	0.7
苯丙胺	0.8	2.6	咖啡因	2.0	6.8	四聚乙醛	2.5	8.5
苯线磷	1.6	5.4	抗蚜威	1.3	4.3	速灭磷	1.3	4.2
吡虫啉	2.5	8.2	可待因	2.7	9.1	特丁硫磷亚砷	1.1	3.6
吡蚜酮	3.9	13	可卡因	0.6	2.1	涕灭威砷	2.6	8.8
丙线磷	1.0	3.5	克百威	0.2	0.8	涕灭威亚砷	2.3	7.5
丙溴磷	3.1	10	克草敌	4.2	14	替苯丙胺	0.4	1.5
残杀威	0.8	2.7	喹禾灵	5.6	18	伪麻黄素	1.6	5.3
茶碱	2.8	9.3	喹硫磷	0.6	2.1	戊菌唑	2.5	8.4
虫线磷	1.6	5.2	乐果	0.9	3.0	西草净	1.3	4.2
除草定	7.4	24	磷胺	1.3	4.4	烯虫酯	2.6	8.8
除虫脲	9.8	32	氯丙嗪	2.8	9.4	烯酰吗啉	4.5	14
单甲脒	1.6	5.4	氯氮平	2.0	6.7	硝西洋	8.1	26
稻瘟灵	0.9	3.1	氯菊酯	13	43	辛硫磷	0.5	1.7
敌百虫	1.6	5.2	氯氰菊酯	41	138	蚜灭磷	2.6	8.5
敌草胺	0.6	2.0	麻黄素	1.3	4.5	烟碱	1.6	5.4
毒虫畏	3.2	10	啉菌酯	3.4	11	乙基谷硫磷	3.9	12
毒死蜱	1.4	4.5	灭虫威	2.5	8.4	乙硫磷	3.4	11
多菌灵	0.9	3.1	灭多威	0.8	2.7	乙酰甲胺磷	2.3	7.8
噁草酮	1.3	4.3	灭蚜磷	0.8	2.6	乙草胺	1.6	5.4
蒂巴因	4.6	15	吗啡	0.7	2.2	盐酸杜冷丁	0.7	2.4
丁硫克百威	1.3	4.5	美沙酮	0.7	2.5	氧乐果	1.3	4.4
定菌磷	2.4	7.9	咪唑啉	12	42	乙拌磷亚砷	5.3	17
啉虫脒	1.1	3.7	咪唑菌酮	3.1	10	乙酰可待因	3.3	11
噁霜灵	1.9	6.3	那可丁	2.5	8.2	乙酯杀螨醇	4.7	15
二苯胺	3.8	12	萘乙酸	1.0	3.3	异丙草胺	0.7	2.4
二甲戊灵	1.0	3.3	哌替啶	0.3	1.1	异丙甲草胺	0.9	2.9
二嗪磷	0.2	0.8	羟亚胺	2.3	7.8	异丙威	0.6	1.9
非那西汀	0.5	1.8	噻霉酮	10	33	异稻瘟净	0.7	2.2
丰索磷	1.8	6.0	三唑醇	2.1	7.2	异噁草酮	1.4	4.6
氟氰戊菊酯	20	69	三唑磷	6.4	21	增效醚	1.7	5.6
氟唑磺隆	11	38	三唑仑	0.9	3.1	仲丁灵	1.6	5.3
甲胺磷	0.5	1.8	三唑酮	3.4	11	仲丁威	3.5	11
甲草胺	1.2	4.1						

参 考 文 献

- [1] 陈建虎. 固相萃取/离子阱气相色谱质谱联用对血液中多种安眠药物的同时测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(01): 84-87.
- [2] ZHANG C, WU H, HUANG X, et al. Simultaneous Determination of Toxic Alkaloids in Blood and Urine by HPLC-ESI-MS/MS [J]. Chromatographia, 2012, 75(9): 499-511.
- [3] 张睿, 王海涛, 吴斌, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测人血液中常见毒品残留量[J]. 分析试验室, 2011, 30(10): 71-74.
- [4] B C R, A I J, DUPONT D H. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(8): 2297-2302.
- [5] 孙雨安, 柯玮, 李振兴, 等. DART-Orbitrap 质谱法快速筛查饲料中磺胺类药物[J]. 质谱学报, 2014, 35(01): 52-58.

- [6] 朱晓月,施捷,张喆,等.实时直接分析质谱法快速筛查葡萄酒中9种甜味剂[J].药物分析杂志,2014,(10):1817-1822.
- [7] LESIAK A D, ADAMS K J, DOMIN M A, et al. DART-MS for rapid, preliminary screening of urine for DMAA[J]. Drug Test Analysis, 2014,6(7/8):788-796.
- [8] 张伟,王雪,秦建平,等. DART-Q-TOF-MS快速鉴别桂枝茯苓胶囊中6种化学成分[J]. 中国中药杂志,2014,39(21):4118-4122.
- [9] VACLAVIK L, CAJKA T, HRBEK V, et al. Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment[J]. Analytica Chimica Acta, 2009,645(1):56-63.
- [10] CAJKA T, DANHELOVA H, VAVRECKA A, et al. Evaluation of direct analysis in real time ionization-mass spectrometry (DART-MS) in fish metabolomics aimed to assess the response to dietary supplementation[J]. Talanta, 2013,115:263-270.
- [11] 孙晓丽,王艳军,彩倩杰,等.基于高分辨质谱独立成分分析的黄芩炮制过程分析[J].河南师范大学学报:自然科学版,2014,42(03):70-74.
- [12] 云环,刘鑫,王静,等.高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱高分辨质谱法快速筛查和确证纺织品中禁用的偶氮染料[J].色谱,2013,31(09):845-849.
- [13] 李鹏飞,吴诚,马萍,等. LC-MS/MS快速筛查中毒药物及典型病例分析[J].北京师范大学学报:自然科学版,2010,46(04):506-509.
- [14] 刘明艳,姚志红,张依,等.两种前处理方法对 LC-MS/MS测定家兔血清中淫羊藿黄酮类化合物基质效应的影响[J].分析测试学报,2011,30(09):1006-1012.
- [15] 谢增瑞,孔维刚.用基质分散固相萃取法用于人血中有机磷农药检测[J].中国法医学杂志,2011,26(01):41-42.
- [16] 张大雷,张吉林,才志成,等. GC/MS衍生化法检测血中4-溴-2,5-二甲氧基苯乙胺[J].刑事技术,2015,40(01):40-44.
- [17] 栾天罡,张展霞.固相微萃取-衍生化技术及其在环境和生物分析中的应用[J].分析化学,2003,31(04):496-500.

Rapid Screening of 130 Toxicants in Blood by Direct Analysis in Real Time-orbitrap High-resolution Mass Spectrometry

SUN Yuan, WANG Ke, LI Zhenxing, YU Wenhao, WANG Guoqing

(College of Material and Chem. Eng., Zhengzhou Univ. of Light Ind., Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Take out the blood samples supernatant 5 μL mesh screen injection modules, which has been extracted by ethyl acetate and then centrifuged. 130 toxicants were analyzed by direct analysis in real time-orbitrap high-resolution mass spectrometry (DART-Orbitrap MS) in positive mode. By comparing the 130 toxicants accurate mass database, a high-throughput method for the screening of toxicants in blood was developed. The results showed the detection limits of these 130 toxicants ranged from 0.2 to 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ and Mass error ($<5 \times 10^{-6}$ μg). The method is simple, rapid, sensitive with a little less solvent consumptive. It is suitable for screening and confirmation of toxicant in blood samples.

Keywords: direct analysis in real time (DART); orbitrap high-resolution mass spectrometry; screening; blood; toxicant