

应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯丙胺类药物进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes
Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用与精神健康服务管理局 (SAMHSA) 颁布, 于 2010 年 10 月生效的新准则, 允许在政府认证的药物检测实验室采用 LC/MS/MS 法确认初步药物测试结果。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生步骤, 因此它远比以前应用的 GC/MS 法要简便的多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的 5 种苯丙胺类药物的分析方法, 并对其线性、检测限 (LOD)、准确度和精密度进行论证, 还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六种简便检测方法之一, 该方法主要使用安捷伦产品进行分析, 包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂, Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μ m 表面多孔 LC 色谱柱, Agilent 1200 Infinity LC 系统以及应用安捷伦喷射流技术 (AJST) 增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。



Agilent Technologies

前言

苯丙胺类药物属于拟交感神经胺类化合物，是很强的神经兴奋剂，其功效和作用类似于内源性神经递质，如肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺。苯丙胺类成分是在草麻黄叶子中发现的（例如麻黄碱），并且于 19 世纪末第一次被合成出来。它们化学结构的特征是具有一个苯乙胺骨架， α 碳上连着一个甲基，还有其它的一些取代基团（如图 1 所示）。很大一部分苯丙胺类化合物以原型药物形式从尿液中排出。通过去甲基化作用，较复杂的苯丙胺类衍生物被代谢为较简单的结构，例如甲基苯丙胺代谢为苯丙胺，MDMA 代谢为 MDA。除了苯丙胺类药物，还有许多其它种类的药物会在人体内代谢成甲基苯丙胺和苯丙胺类物质，这就是所谓的苯丙胺类生成药物或苯丙胺前体化合物，例如安非他尼、氯苄苯丙胺、芬乙茶碱和丙炔苯丙胺等。2011 版的 SAMHSA 准则要求对 5 种苯丙胺类药物进行筛选并确认，分别是苯丙胺、甲基苯丙胺、MDA、MDMA 和 MDEA。所用分析方法应具备使这些药物与其结构类似物相区分的能力，以确保避免潜在的干扰，这些干扰物包括麻黄碱、伪麻黄碱、芬特明和苯丙醇胺（即 PPA 或去甲麻黄碱）等。

在检测苯丙胺类药物的传统 GC/MS 法中，通常用高碘酸预处理来氧化羟基苯乙胺类成分如麻黄碱和伪麻黄碱，以排除此类化合物的干扰。我们取消了这一步骤，而是依据最新 SAMHSA 准则中所要求的对所有目标分析物实现了可靠的色谱分离。

新的 SAMHSA 准则规定苯丙胺类药物的最高限量浓度为 250 ng/mL，检测限为限量浓度的 10%，即 25 ng/mL。由于预计在一些尿样中可能出现高浓度苯丙胺类药物（如同阿片类药物），我们选择使用更高容量的 3 mm id Agilent Poroshell 120 色谱柱代替所有以前安捷伦 SAMHSA 方法中的 2 mm id 色谱柱。与亚 2 μ m 的 UHPLC 色谱柱相比，填充了 2.7 μ m 表面多孔颗粒的 Poroshell 120 色谱柱具有与其类似的柱效，但其背压却减少了 40% 左右。因此，它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规液相色谱系统上使用更高的流速来提高分辨率，同时缩短分析时间和再平衡时间。

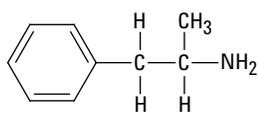
由于 Agilent Bond Elut Plexa 的独特性质，本文所描述的提取方法获得了苯丙胺类药物极高的回收率，且重复性好。不像其它聚合物吸附剂，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重复性的实现，主要得益于色谱柱填料的窄粒径分布，并且不含易引起堵塞的细颗粒。

在较小的样品进样体积（2 μ L）和无预富集的条件下，该方法获得了极好的信噪比（样品浓度 25ng/mL 时 >400:1，该浓度只有 SAMHSA 规定限量浓度的 10%），这得益于应用了 AJST 技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

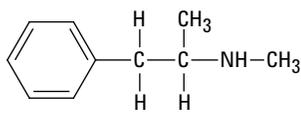
安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发，2010）采用的是 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品和操作步骤。

实验部分

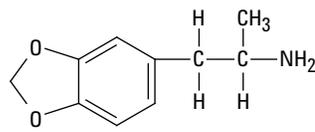
分析物



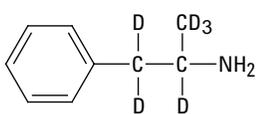
苯丙胺
Log P 1.79 pKa 9.8



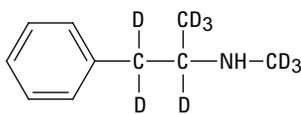
甲基苯丙胺
Log P 1.94 pKa 9.5



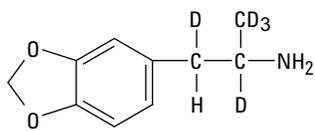
MDA
Log P 1.67 pKa 9.7



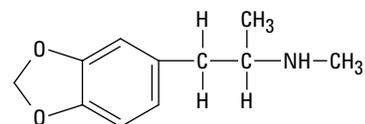
苯丙胺-D₆



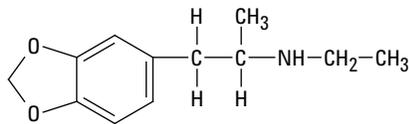
甲基苯丙胺-D₉



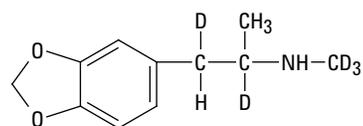
MDA-D₅



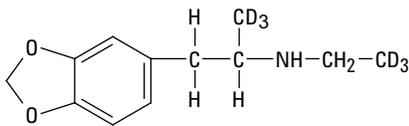
MDMA
Log P 2.05 pKa 9.9



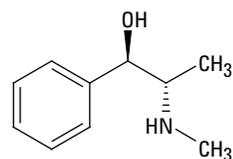
MDEA
Log P 2.34 pKa 9.9



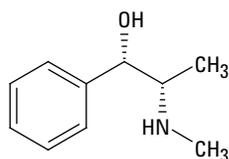
MDMA-D₅



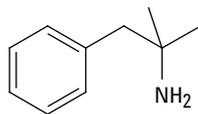
MDEA-D₆



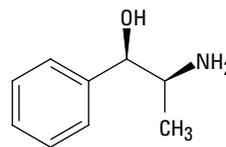
麻黄碱
Log P 1.13 pKa 9.6



伪麻黄碱
Log P 0.89/1.1 pKa 9.9



芬特明
Log P 2.16 pKa 10.1



苯乙醇胺
Log P 0.81 pKa 9.4

图 1. 苯丙胺类药物与其干扰物及这些分析物的结构

药物标准品购自 Cerilliant 公司, 为 1 mg/mL (苯丙胺、甲基苯丙胺、MDA、MDMA、MDEA、麻黄碱、伪麻黄碱、芬特明和苯丙醇胺) 和 100 µg/mL (苯丙胺-D₆、甲基苯丙胺-D₉、MDA-D₅、MDMA-D₅ 和 MDEA-D₆) 的甲醇溶液。

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg, 3 mL (部件号 12108303)
- Agilent VacElut 20 多管真空装置 (部件号 12234100)
- Agilent 截止阀 (部件号 12234520)
- Agilent 2 mL 自动进样器样品瓶 (部件号 5182-0716)
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖 (部件号 5182-0717)

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱 (部件号 699975-302)
- Agilent 1260 Infinity LC 系统 (G1379B 微型脱气机, 低延迟体积配置的 1312B 二元泵, G1367E 自动进样器, G1330B 柱温箱)

MS

- 配有应用安捷伦 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

预处理

往 0.5 mL 尿液中加入各内标物, 使浓度均为 500 ng/mL, 推荐使用 12 × 75 mm 玻璃试管。加入 1 mL 2% 甲酸溶液, 涡旋, 若溶液浑浊则离心。

萃取

- 用 0.5 mL 甲醇活化 Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱, 浸润, 然后使其自然滴出
- 上样/加载上清液
- 淋洗 1: 1 mL 2% 甲酸溶液
- 淋洗 2: 1 mL 甲醇
- 在真空 (10–15 英寸汞柱) 条件下, 抽干 5-10 分钟
- 用 1 mL 新鲜配制的乙酸乙酯: 甲醇: 氢氧化铵 (50:50:20) 溶液洗脱。先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中, 然后用低真空 (2-3 英寸汞柱) 抽滤

7. 在低于 37 °C 条件下用氮气将洗脱液吹干至 0.2 mL

8. 在洗脱液中加入 100 µL 0.025 M 盐酸溶液, 涡旋

9. 蒸干

10. 用 0.5 mL 初始流动相 (15% 甲醇, 85% 水和 0.1% 甲酸) 复溶。

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1% 甲酸水溶液	
流动相 B	0.1% 甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间 (分钟)	% B
	0.0	15
	1.5	15
	3.5	30
	3.6	90
	6.6	90
	6.7	15

停止时间	6.8 min
后运行时间	2 min
最高泵压	400 bar
进样体积	2 µL
进样并洗针	
洗针	用 75: 25 甲醇: 水冲洗进样口 10 秒
禁止重叠进样	
禁止自动减小延迟体积	

MS 条件

ES 离子源参数

离子检测模式	正离子
毛细管电压	4,000 V
干燥气流速	10 L/min
干燥气温度	350 °C
雾化气压力	35 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	400 °C
喷嘴电压	0 V

MS 参数

扫描类型	MRM
预运行脚本	SCP_MS DiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 0.6 min (干扰物分离) 或 1.2 min (仅 5 种苯丙胺类药物) – 切换到 MS
Delta EMV (+)	200 V

结果与讨论

在酸性 pH 条件下，苯丙胺类药物的氨基基团质子化，从而分析物可以通过疏水作用和强阳离子交换作用被高效的保留在 Plexa PCX 聚合物吸附剂上。

用 100% 甲醇淋洗可消除大部分的基质干扰，但吸附剂上的分析物没有损失。为了打破苯丙胺类药物与强阳离子吸附剂之间的离子相互作用，在有机洗脱液中添加了一种强碱。在进行样品洗脱之前，将 20% 氢氧化铵溶液添加到组成为 50% 乙酸乙酯和 50% 甲醇的双组分洗脱剂中，以提高回收率。

苯丙胺类药物易挥发，并且容易在样品制备过程中随溶剂的蒸发而损失，除非加入盐酸将其以盐的形式沉淀。最好在蒸发即将结束时加入 HCl，以避免形成会造成离子抑制的氯化铵盐。

图 2 显示了采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱可出色地实现 5 种苯丙胺类药物与 SAMHSA 规定的潜在干扰物的分离，并且分析可在 3.2 min 内完成。液相色谱分离首先采用低有机溶剂比例（15%）的流动相，使尿液中的盐类和其它极性成分在样品运行开始时先被洗脱。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液，以尽量减少离子源污染。切换阀将液流转至质谱检测器后即刻开始数据采集。0.8 mL/min 的流速可获得较短的分析时间和再平衡时间。

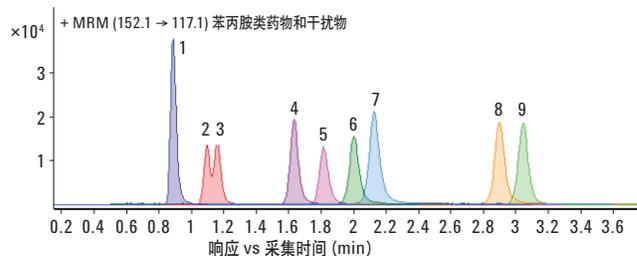


图 2. 苯丙胺类药物与其潜在干扰物在 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3×50mm, 2.7 μm 色谱柱上分离的叠加 MRM 提取离子色谱图。每个分析物的浓度均为 50 ng/mL。色谱峰按洗脱顺序分别为: 1. 苯丙醇胺; 2. 麻黄碱; 3. 伪麻黄碱; 4. 苯丙胺; 5. 甲基苯丙胺; 6. MDA; 7. MDMA; 8. MDEA; 9. 芬特明

进行多种化合物分析时，推荐使用利用一个特定转换离子，通过保留时间和 ΔRT（时间窗）调整的动态 MRM 方法。当确定干扰组分可以完全分离出去时，我们就可以只关注五种苯丙胺类药物的数据采集，此时可在 1.2 min 而非 0.6 min（MS 方法的第 1 个时间段）将切换阀从废液瓶转向 MS 检测器。

SAMHSA 准则要求分析目标化合物和内标物时必须使用一个定量离子和至少一个定性离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1）信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物名称	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
苯丙胺	136.1	119.1	64	4
苯丙胺	136.1	91.1	64	14
苯丙胺-D ₆	142.1	125.1	66	5
苯丙胺-D ₆	142.1	93.1	66	13
MDA	180.1	163.1	92	5
MDA	180.1	105.1	92	17
MDA-D ₅	185.1	168.1	68	5
MDA-D ₅	185.1	110.1	68	21
MDEA	208.1	163.1	88	8
MDEA	208.1	133.1	88	17
MDEA	208.1	105.1	88	21
MDEA-D ₆	214.2	166.1	90	8
MDEA-D ₆	214.2	108.1	90	25
MDMA	194.1	163.1	84	5
MDMA	194.1	135.1	84	17
MDMA	194.1	105.1	84	21
MDMA-D ₅	199.1	165.1	82	4
MDMA-D ₅	199.1	107.1	82	25
甲基苯丙胺	150.1	119.1	80	4
甲基苯丙胺	150.1	91.1	80	16
甲基苯丙胺-D ₉	159.2	125.2	77	5
甲基苯丙胺-D ₉	159.2	93.1	77	13
麻黄碱-伪麻黄碱	166.1	133.1	80	21
芬特明	150.1	133.1	80	6
苯丙醇胺	152.1	117.1	80	20

5 种苯丙胺类药物的定量色谱峰在样品浓度为 25 ng/mL 时获得的信噪比均超过 400: 1 (如图 3, 上图所示。图中标注了 MDEA 定量色谱峰的 S/N 值)。这说明了 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能, 能够非常可靠地检测远低于 SAMHSA 限量浓度的 5 种苯丙胺类药物。

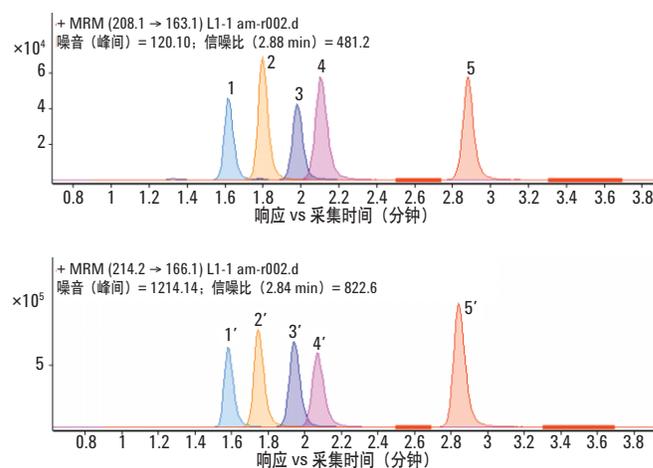


图 3. 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50mm, 2.7 μm 色谱柱分析尿液提取物中的苯丙胺类药物 (25 ng/mL) 与各内标物 (500ng/mL) 的定量峰重叠 MRM 提取离子色谱图。色谱峰按洗脱顺序分别为: 上图: 1. 苯丙胺; 2. 甲基苯丙胺; 3. MDA; 4. MDMA; 5. MDEA, 下图: 1'. 苯丙胺-D₆; 2'. 甲基苯丙胺-D₉; 3'. MDA-D₅; 4'. MDMA-D₅; 5'. MDEA-D₆。噪声区域以加粗的形式显示

图 4 给出了 5 个浓度水平的尿液提取物中标准品的校准曲线。通过分别向阴性尿液中加入各苯丙胺类药物标准品，制备浓度分别为 25、250、1000、5000 和 10,000 ng/mL 的一系列校准标准溶液。每种分析物的氘代内标浓度为 500 ng/mL。各曲线优异的线性关系 ($R^2 > 0.999$) 表明该方法在很宽的动态浓度范围内呈线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

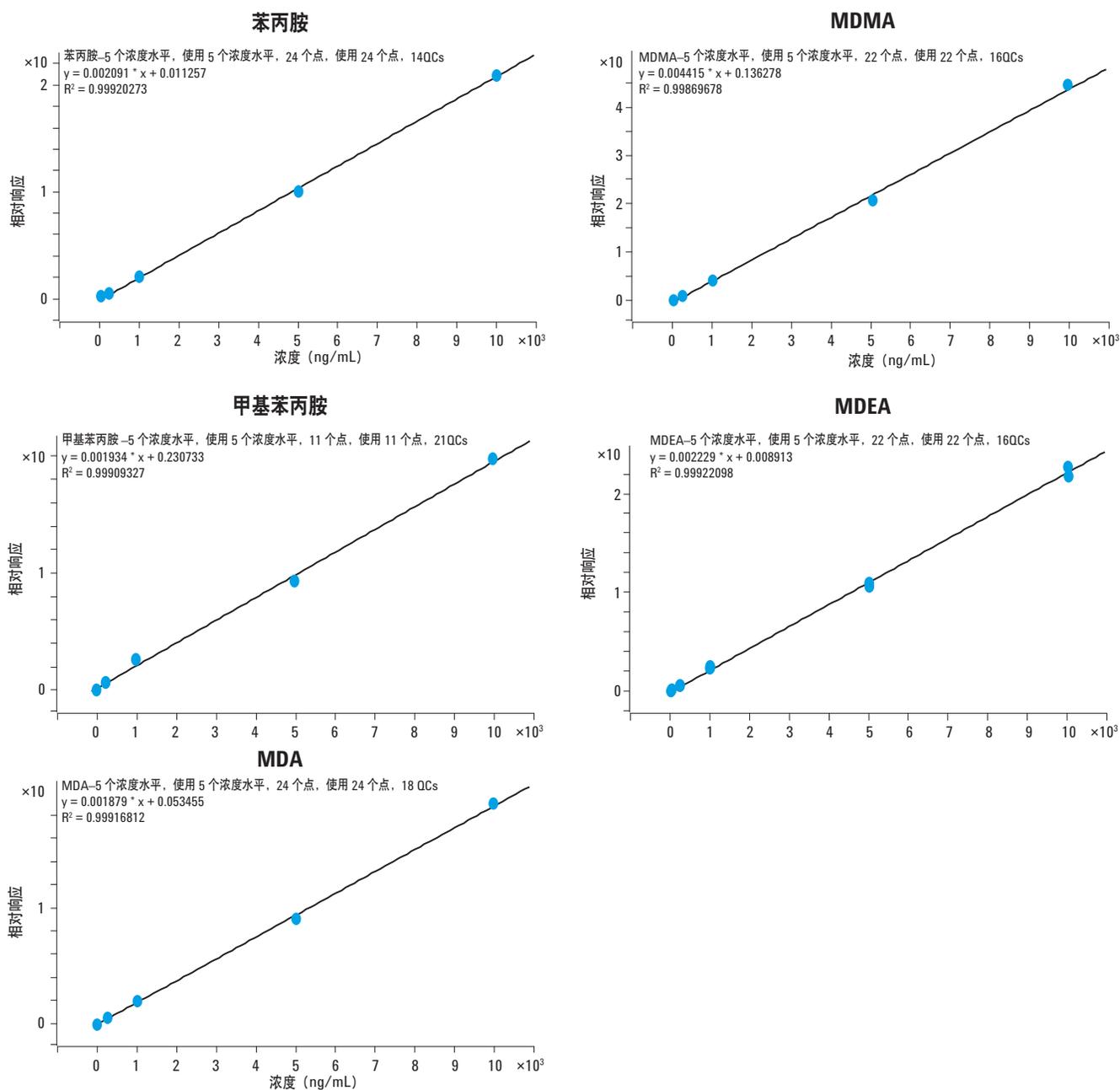


图 4. 尿液提取物中五种苯丙胺类药物的校准曲线示例。浓度范围从 25 到 10,000 ng/mL。线性相关系数 $R^2 > 0.999$

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等 (2003) 提出的原则计算得到的, 其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下: 第一组, 将限量浓度水平的五种苯丙胺类药物预加到阴性尿液中, 然后进行 SPE 萃取, 平行五份, 进样分析。第二组, 将阴性尿液利用相同的方法进行萃取, 然后萃取物用初始流动相溶液复溶, 之后加入五种苯丙胺类药物标准品到 250 ng/mL (固相萃取后加标), 平行五份, 进样分析。第三组是直接加标至初始流动相 (即复溶溶剂), 使其浓度为 250 ng/mL 的限量浓度 (流动相加标)。

处理效率 (即绝对回收率) 是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析, 获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析, 获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的提取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品, 获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数 (CV) 用来衡量重复性, 系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得的。

表 2 显示五种苯丙胺类药物的萃取回收率均大于等于 94%, 五种分析物中的四种处理效率高于 90%; 只有苯丙胺的处理效率是 86%。较高的基质效应 (91-99%) 表明只有 1-9% 的信号由于离子抑制作用而损失。从而证明了经 Plexa 处理的提取物纯净度极高。同时该方法具有极高的准确度 (目标物浓度的 $\pm 10\%$ 以内) 和极好的精密度 ($CV < 1.1\%$)。

结论

本文所描述的固相萃取样品制备与 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全遵循 SAMHSA 要求, 为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高精密度、准确度和重现性的有法律效力的数据结果。其硬件配置与 2011 版 SAMHSA 方法中的相同均来自安捷伦。这些方法特别为安捷伦 1100 和安捷伦 1200 LC 系列的所有用户开发, 这些 LC 系统的背压均不超过 400 bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时, 离子源参数可以很容易地修改。安捷伦科技可提供电子版本的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

表 2. 分析方法评价, $n = 5$

参数	苯丙胺	甲基苯丙胺	MDA	MDMA	MDEA
处理效率* (%)	86	93	91	93	95
萃取回收率* (%)	94	94	95	97	96
基质效应* (%)	91	99	95	96	98
准确度** (%)	107	105	92	101	106
精密度 (CV)** (%)	0.6	0.5	1.1	0.5	0.3

* 限量浓度条件下测定

** 苯丙胺、MDA、MDMA 和 MDEA 在限量浓度的 40% 条件下测定, 甲基苯丙胺在限量浓度条件下测定

参考文献

1. Anon (2011) Drugs Testing Book 2011.
<http://drugstestingbook.com/>
2. R. Baselt, (2008) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. J. Hughes, and P. Moorman, (2011) "Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing". Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem.
4. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng, (2003) "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS". *Analytical Chemistry*, 75: 3019-3030.
5. P. Moorman and J. Hughes, (2010) "Amphetamines (expanded) in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS)". SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5865EN.
6. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.
7. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Roper-Miller, (2010) "A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples II: amphetamine, methamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyethylamphetamine, phencyclidine, and (±)-11-nor-9-carboxy- Δ^9 - tetrahydrocannabinol". *Journal of Analytical Toxicology*, 34: 430-443.

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

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，2012

2012年1月13日，中国印刷

5990-9623CHCN



Agilent Technologies