

# 应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 和 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯甲酰爱康宁进行 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 准则要求的苯甲酰爱康宁的分析方法, 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 $\mu$ m 表面多孔 LC 色谱柱, Agilent 1200 Infinity LC 系统以及采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

苯甲酰爱康宁 (BE) 是可卡因存在于尿液中的一种主要代谢产物, 可卡因是强烈的具有成瘾性的神经系统兴奋剂和局部麻醉剂。可卡因可在酶催化下水解为苯甲酰爱康宁 (发生在肝脏), 也可以不经过酶催化, 而在碱性 pH 条件下生成苯甲酰爱康宁 (Anon., 2011)。苯甲酰爱康宁可在摄入可卡因后的几天内在尿液中检出。在冷冻贮藏的尿样中苯甲酰爱康宁相对稳定, 而在较高温度和碱性条件下, 它能进一步发生水解。SAMHSA 规定苯甲酰爱康宁的最高限量浓度为 100 ng/mL, 其检测限为限量浓度的 10%, 即 10 ng/mL。

由于 Agilent Bond Elut Plexa 吸附剂的独特性质, 本文所描述的提取方法实现了对苯甲酰爱康宁萃取的高回收率提取, 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。高流速和良好重现性的实现, 主要得益于 Plexa 柱填料的窄粒径分布, 并且不存在容易导致堵塞的细颗粒。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱是由于其具有较高的载样量和极佳的分离性能。填充表面多孔 2.7 μm 颗粒的 Poroshell 120 色谱柱能提供与亚 2 μm UHPLC 色谱柱类似的柱效, 但其背压却减少了约 40%。因此, 它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规液相系统上采用较高的流速来提高分辨率, 并同时缩短分析时间和再平衡的时间。

在较小的样品进样体积 (2 μL) 且无样品预富集的条件下, 该方法具有极佳的信噪比 (样品浓度 10 ng/mL 时 >400:1, 此浓度是 SAMHSA 规定限量浓度的 10%), 这得益于采用了 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 SPE/LC 产品和操作步骤。

## 实验部分

### 分析物

药物标准品购自 Cerilliant 公司, 为 1 mg/mL (苯甲酰爱康宁) 和 100 μg/mL (苯甲酰爱康宁-D<sub>8</sub>) 的甲醇溶液。

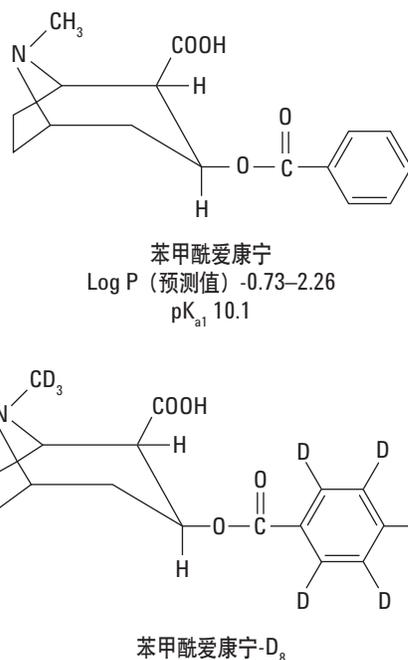


图 1. 苯甲酰爱康宁分析物及其化学结构。log P 预测值来自 DrugBank, ChemSpider, PubChem

## 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)

### SPE

- 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 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 1 mL 尿液中加入内标, 使其浓度为 200 ng/mL; 推荐使用 12 x 75 mm 玻璃试管。加入 1 mL 2%甲酸溶液, 涡旋, 如溶液浑浊则离心。

### 萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Bond Elut Plexa PCX 小柱, 浸润, 然后使其自然滴出
2. 上样或加载上清液
3. 淋洗 1: 1 mL 2%甲酸溶液
4. 淋洗 2: 1 mL 甲醇
5. 在真空 (10–15 英寸汞柱) 条件下, 抽干 5–10 分钟
6. 用 1 mL 新鲜配制的甲醇: 氢氧化铵 (100: 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. 氮气吹干
8. 用 1 mL 初始流动相 (10%甲醇, 90%水, 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	10
	0.5	10
	2.5	70
	2.51	90
	5.5	90
	5.51	10
停止时间	5.6 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: 水溶液冲洗进样口 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	3,000 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: 1.2 min-切换阀到 MS
Delta EMV(+)	200 V

## 结果与讨论

在酸性 pH 条件下, 苯甲酰爱康宁的叔胺基团质子化, 从而分析物可以通过疏水保留与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 SPE 小柱能消除大部分的基质干扰, 同时不会造成 BE 损失。向有机洗脱液中添加一种强碱, 目的是破坏分析物和强阳离子交换吸附剂间的离子相互作用。在样品洗脱前, 将 20% NH<sub>4</sub>OH 溶液加到甲醇中, 以提高苯甲酰爱康宁的回收率。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱能实现尿液萃取物中苯甲酰爱康宁的快速分离, 并可获得极佳的峰形 (如图 2 所示)。液相色谱分离首先采用低有机溶剂比例 (10%) 的流动相, 从而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 (0 到 1.2 分钟), 使离子源污染最小化。在第 1.2 分钟时切换阀将液流转至质谱检测器后立即开始数据采集。流速 0.8 mL/min 条件下, 可获得较短的分析时间和再平衡时间。

浓度为 10 ng/mL 时, 色谱峰的信噪比 >400:1 (如图 2, 上图所示)。这表明 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能, 能够可靠地检测远低于 SAMHSA 规定限量浓度的苯甲酰爱康宁 (10%)。

SAMHSA 法规要求分析目标分析物和内标物时必须监测一个定量离子和至少一个定性的离子。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	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
BE	290.1	168.1	90	15
BE	290.1	105.1	90	30
BE	290.1	82.1	90	32
BE-D <sub>5</sub>	298.2	171.1	90	15
BE-D <sub>5</sub>	298.2	110.1	90	30

图 3 是五个浓度水平的尿液萃取物中苯甲酰爱康宁标准品的校准曲线。通过向阴性尿液中加入苯甲酰爱康宁标准品, 制备浓度分别为 10、100、500、1000 和 4000 ng/mL 的 BE 系列校准标准溶液。添加氘代内标物 BE-D<sub>8</sub> 的浓度为 200 ng/mL。线性关系极为优异, 线性相关系数  $R^2 = 0.998$  证明本方法在一个较宽的动态浓度范围内具有极佳的线性, 符合 SAMHSA 准则的要求。

本方法采用 MRM 扫描模式, 设置为常态而非动态检测, 因为动态 MRM 模式对单一化合物的检测没有优势。

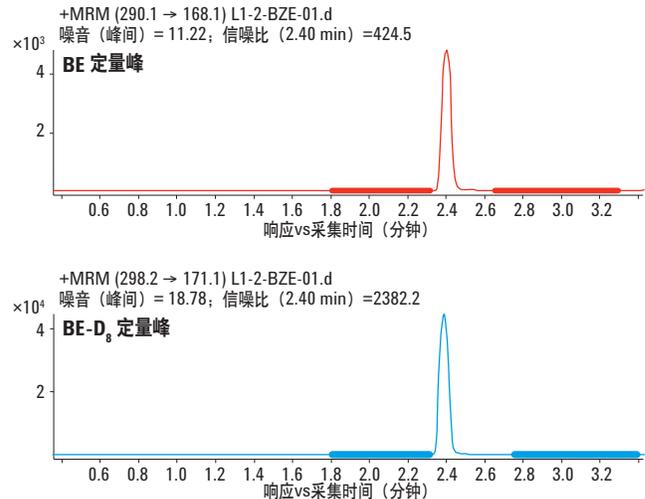


图 2. 尿液萃取物中 BE (10 ng/mL) 和 BE-D<sub>8</sub> (200 ng/mL) 的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱。噪声区域以加粗的形式显示

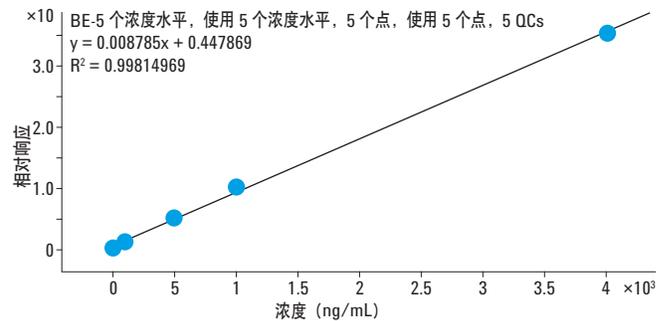


图 3. 尿液萃取物中苯甲酰爱康宁的校准曲线示例。校准浓度范围 10 到 4000 ng/mL, 线性相关系数  $R^2 = 0.998$

## 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 BE 预加到阴性尿液中, 然后进行萃取, 平行五份, 进样分析。第二组, 将阴性尿液利用同样方法进行萃取, 然后萃取物用初始流动相溶液复溶, 之后加入苯甲酰爱康宁至 100 ng/mL, 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 100ng/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。

表 2 数据表明本方法分析苯甲酰爱康宁具有较高的萃取回收率 (86%), 同时也获得了极佳的准确度 (102%) 和精密度 (0.7%)。99% 的基质效应表明只有 1% 的信号因基质干扰引起的微弱离子抑制作用而损失, 从而证明了经 Plexa 吸附剂处理的提取物具有优异的纯净度。

表 2. 在限量浓度条件下进行方法评价,  $n = 5$

	%
处理效率 *	85
萃取回收率 *	86
基质效应 *	99
准确度 **	102
精密度 ** (CV)	0.7

\* 在限量浓度条件下测定

\*\* 在 40% 限量浓度条件下测定

## 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符合 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准确度、高精密度、高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 系统的最高背压均不超过 400bar。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进行修改。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。

## 参考文献

1. Anon. (2011) *Drugs Testing Book 2011*.  
<http://drugtestingbook.com/>
2. R. Baselt (2008) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. K. E. Billings (2003) "Development of a Simple Method to Detect and Quantify Benzoylgonine, a Cocaine Metabolite, in Urine". Honors Projects. Paper 5. Illinois Wesleyan University. [http://digitalcommons.iwu.edu/chem\\_honproj/5](http://digitalcommons.iwu.edu/chem_honproj/5)
4. 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/cn](http://www.agilent.com/chem/cn).
5. P. M. Jeanville, E. S. Estapé, S. R. Needham, and M. J. Cole (2000) "Rapid confirmation/quantitation of cocaine and benzoylgonine in urine utilizing high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11 ( 3): 257-263.
6. 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.
7. P. Moorman and J. Hughes (2010) "Benzoylgonine in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS)". SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5866EN.
8. SAMHSA (2010) "Manual for Urine Laboratories", National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.
9. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Roper-Miller (2009) "A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples for morphine, codeine, 6-acetylmorphine, and benzoylgonine". *Journal of Analytical Toxicology*, 33: 398-408.

## 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](http://www.agilent.com/chem/cn)。

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

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

本资料中的信息、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10日，中国印刷  
5990-9624CHCN



**Agilent Technologies**