

# 应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的阿片类药物（吗啡和可待因）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 准则要求的阿片类药物的分析方法，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 柱，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

阿片类药物（吗啡和可待因）是在罂粟树脂中发现的天然生物碱。可待因是目前世界上使用最广泛的阿片类药物。除了吗啡和可待因的检测，SAMHSA 准则还要求该分析方法应具备使这些药物与其结构类似化合物分离的能力，这些结构类似化合物包括半合成的阿片类药物：氢吗啡酮、羟吗啡酮、氢可酮、羟考酮和可待因的代谢产物去甲可待因。所有这些药物均可与人类的阿片受体结合发挥作用。除了作为止痛处方药使用外，它们还用于娱乐用途，并且可导致阿片类药物依赖，高剂量的阿片类药物/鸦片可导致呼吸衰竭而致人死亡。

吗啡和可待因在体内均可广泛代谢。吗啡主要代谢为吗啡-3-葡萄糖苷酸和吗啡-6-葡萄糖苷酸。可待因的主要代谢产物是吗啡、可待因-6-葡萄糖苷酸和去甲可待因。由于在尿液中发现的吗啡和可待因均主要以葡萄糖苷酸缀合物的形式存在，因此 SAMHSA 要求测定每一种化合物的总浓度。分析前必须将葡萄糖苷酸缀合物完全转换为母体药物。确保游离的阿片类药物完全转化的最可靠的转换方法是酸水解。过去常用的酶解法已被证实不能使母体化合物转换完全，这可能会导致假阴性的结果（Wang 等，2006）。

SAMHSA 规定吗啡和可待因的最高限量浓度为 2000 ng/mL。由于预计在一些尿样中可能出现高浓度的阿片类药物（还有安非他明），我们选择使用更高容量的 3mm id Agilent Poroshell 120 色谱柱代替所有以前安捷伦 SAMHSA 方法中的 2mm id 色谱柱。与亚 2  $\mu\text{m}$  的 UHPLC 色谱柱相比，填充了 2.7  $\mu\text{m}$  表面多孔颗粒的 Poroshell 120 色谱柱具有与其相似的柱效，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 LC 系统上通过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吗啡和可待因极高的回收率，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  $\mu\text{L}$ ）和无预富集的条件下，该方法对吗啡和可待因均获得了极佳的信噪比（样品浓度 200 ng/mL 时 >150:1，该浓度为 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）采用了 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品及操作步骤。

## 实验部分

### 分析物

药物标准品购自 Cerilliant 公司, 为 1 mg/mL (吗啡、可待因、氢吗啡酮、去甲可待因、氢可酮、羟考酮、羟吗啡酮和吗啡 3-葡萄糖苷酸) 和 100  $\mu$ g/mL (吗啡-D<sub>6</sub> 和可待因-D<sub>6</sub>) 的甲醇溶液。

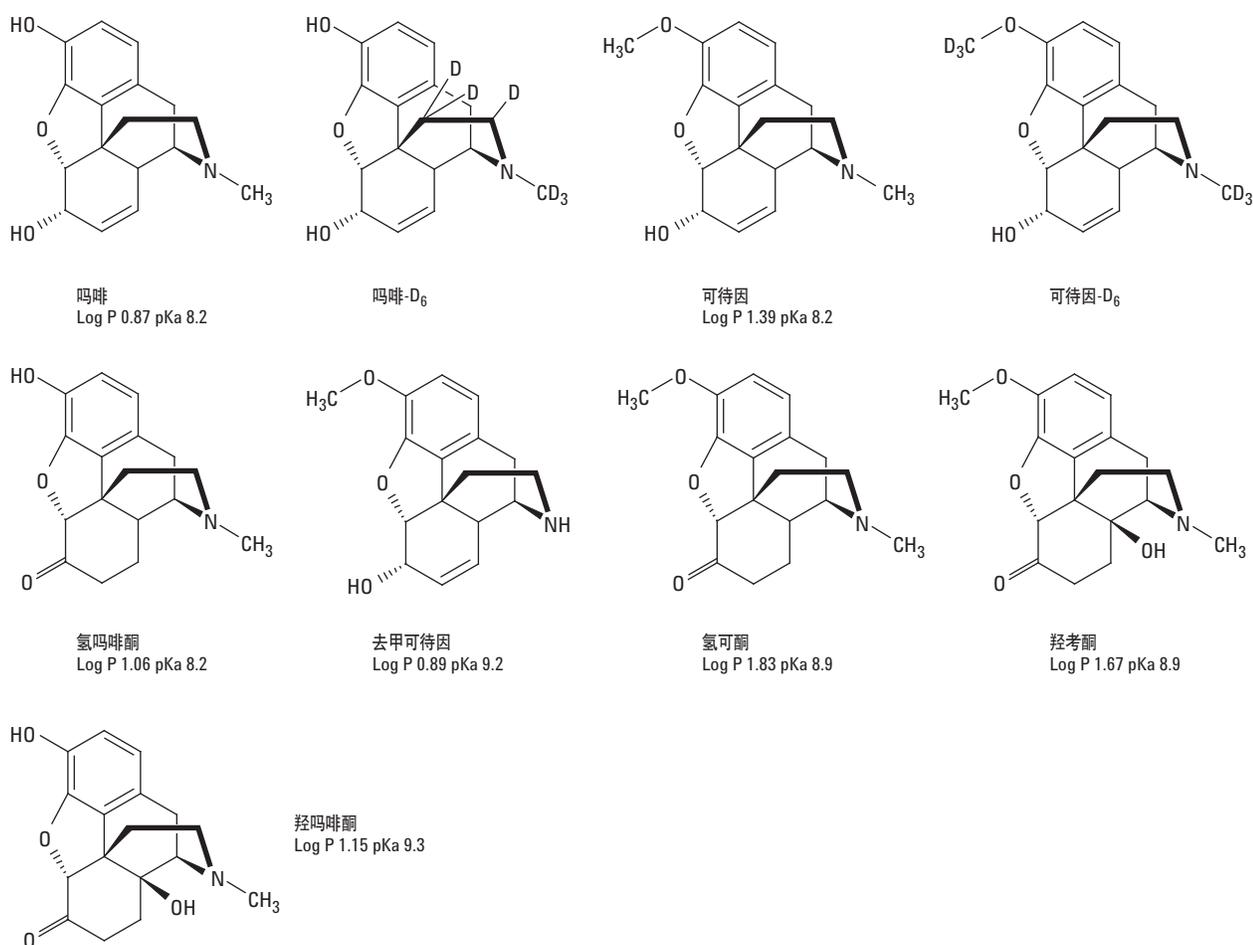


图 1. 阿片类分析物及其结构

## 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 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

## 样品制备

### 水解与样品预处理

- 往 0.5 mL 尿液中加入内标, 使其浓度为 1000 ng/mL; 推荐使用 12 × 75mm 玻璃试管
- 加入 125 μL 浓盐酸
- 在加热装置中于 95 ± 5 °C 水解 90 min
- 冷却。然后加入 2 mL 0.1 M 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5)
- 用 250 μL 7 M 的 KOH 溶液中和, 涡旋, 测定其 pH 值, 应小于 6
- 以 6000 rpm 的速度离心 20min

### 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
- 上样或加载上清液
- 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 2 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
- 在 40 °C 下蒸干
- 用 0.5 mL 初始流动相 (5% 甲醇, 95% 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	5
	0.5	5
	1.5	25
	2.5	55
	2.6	90
	5.6	90
	5.7	5

停止时间	5.8 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	用甲醇: 水 (75: 25) 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	动态 MRM
预运行脚本	SCP_MS DiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.0min-切换到 MS
Delta EMV (+)	0 V

## 结果与讨论

在酸性 pH 条件下, 吗啡、可待因及其衍生物的叔胺基质子化, 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 SPE 小柱可消除大部分的基质干扰而不会造成阿片类药物损失。在有机洗脱液中添加强碱, 以破坏分析物与强阳离子交换吸附剂之间的离子相互作用。在进行样品洗脱之前, 将适量 20% 氢氧化铵溶液添加到甲醇中, 以提高阿片类药物的回收率。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50mm, 2.7 μm 色谱柱能实现阿片类药物及其潜在干扰化合物的良好分离, 并获得了极佳的峰形, 同时分析可在 2.5min 内完成 (如图 2 所示)。液相色谱分离首先采用低有机溶剂比例 (5%) 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 (0 到 1 min), 以尽量减少离子源污染。1.0 min 时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。

在图 2 所示色谱图中, 只有可待因和去甲可待因这一对色谱峰 (峰 4 和 5) 部分分离, 但由于这些化合物具有不同的母离子和转换离子, 因此可待因定量时去甲可待因信号所产生的任何可能的干扰都可以排除。

在另一项实验中, 测试了 Plexa PCX 吸附剂是否存在使去甲可待因甲基化并转换为可待因的可能性。试验结果均为阴性; 在添加了去甲可待因标准品的阴性尿样中并未检测到可待因, 因此本文可采用上述提取方法。

在进行干扰物测试时, 推荐使用利用一个特定转换离子, 通过保留时间和  $\Delta RT$  (时间窗) 调整的动态 MRM 方法。当然, 一旦确定干扰组分已经分离出去, 吗啡、可待因及其内标物的数据采集即可通过常规的 MRM 进行。

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	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
可待因	300.2	215.1	130	23
可待因	300.2	165.1	130	46
可待因	300.2	153.1	130	50
可待因-D <sub>6</sub>	306.2	165.1	130	44
可待因-D <sub>6</sub>	306.2	218.1	130	23
吗啡	286.1	201.1	130	23
吗啡	286.1	181.1	130	40
吗啡	286.1	165.1	130	43
吗啡-D <sub>6</sub>	292.1	181.1	130	40
吗啡-D <sub>6</sub>	292.1	165.1	130	42
吗啡-3-葡萄糖苷酸	462.2	286.1	162	45
羟考酮	316.2	298.1	130	15
羟吗啡酮	302.2	284.1	130	17
氢可酮	300.2	199.1	130	30
去甲可待因	286.1	225.1	130	20
氢吗啡酮	286.1	185.1	130	28

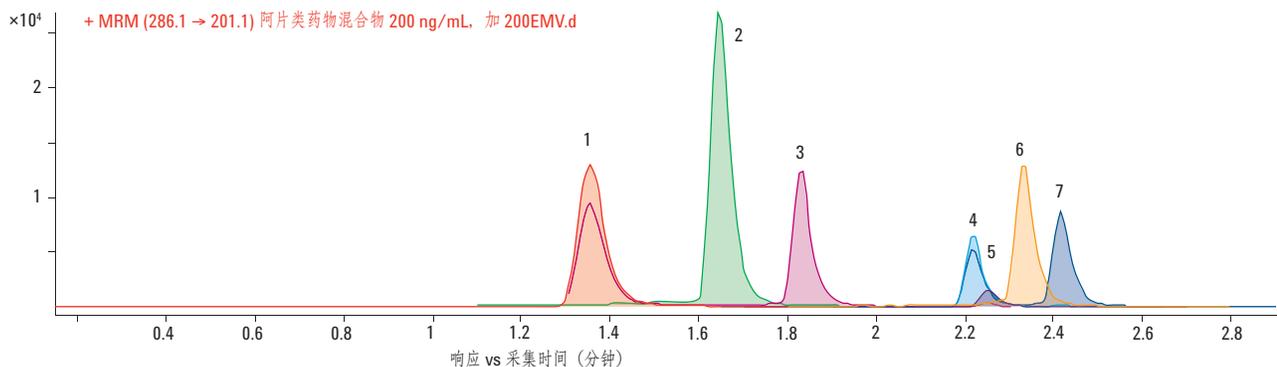


图 2. 阿片类药物与其潜在干扰物在 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50mm, 2.7 μm 色谱柱上分离的叠加 MRM 提取离子色谱图。各分析物在尿液中的浓度均为 200 ng/mL。色谱峰按洗脱顺序分别为: 1、吗啡; 2、羟吗啡酮; 3、氢吗啡酮; 4、可待因; 5、去甲可待因 (紫红色小峰); 6、羟考酮; 7、氢可酮

按照上述步骤处理样品时,尿液中加标浓度为 10,000 ng/mL 的吗啡-β-3-葡萄糖苷标准品有 97-99.2%转换为吗啡。吗啡-β-3-葡萄糖苷酸分析所用的 MS 参数列于表 1 中,供有兴趣检测水解效率的分析人员参考。

吗啡和可待因的定量峰在浓度为 200 ng/mL 时获得的信噪比超过 150:1 (如图 3, 上面的 1 和 2 图所示)。这说明 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 限量浓度的阿片类药物。

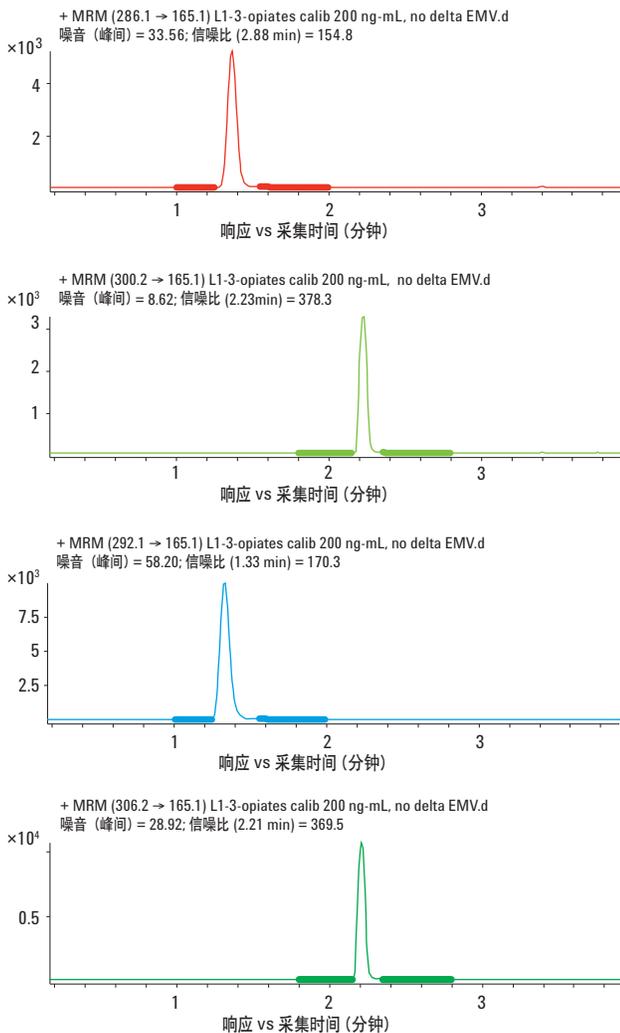


图 3. 尿液提取物中吗啡与可待因 (200 ng/mL) 和吗啡-D6 与可待因-D6 (1000 ng/mL) 的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱。噪声区域以加粗的形式显示

图 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吗啡和可待因标准品,制备两者浓度分别为 200、1000、2000、10000 和 20000 ng/mL 的一系列校准标准溶液。添加氘代内标吗啡-D6 和可待因-D6 的浓度均为 1000ng/mL。各曲线良好的线性关系 ( $R^2 \geq 0.998$ ) 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。

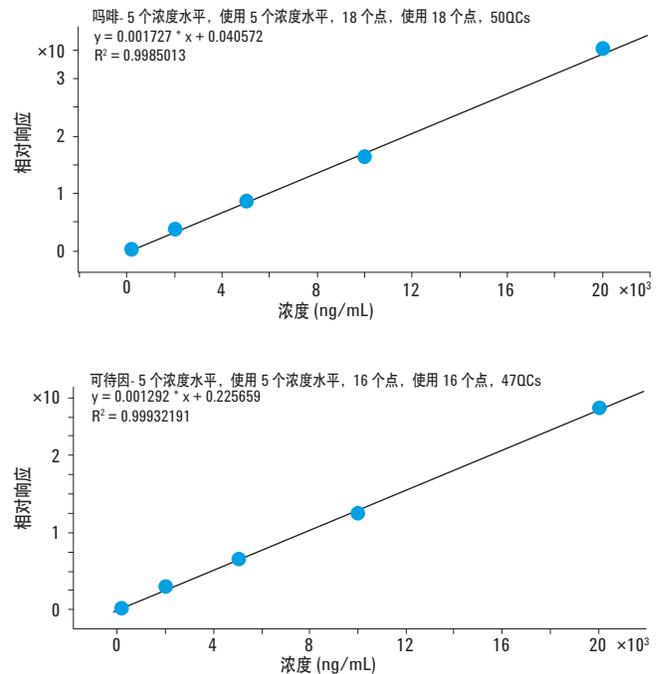


图 4. 从尿液中提取的吗啡 (上图) 和可待因 (下图) 的校准曲线示例。浓度范围为 200 至 20 000 ng/mL。线性相关系数  $R^2 \geq 0.998$

## 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, 将限量浓度水平的吗啡和可待因预加到阴性尿液中, 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, 之后加入吗啡和可待因标准品到 2000 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 2000 ng/mL 的限量浓度 (流动相加标)。

表 2. 在限量浓度条件下阿片类药物的分析方法评价,  $n=5$

参数	吗啡	可待因
处理效率 (%)	83	85
萃取回收率 (%)	85	86
基质效应 (%)	98	99
准确度 (%)	108	108
精密度 (CV) (%)	0.6	0.7

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 显示了啡和可待因的高提取回收率和高处理效率 (约 85%)。高基质效应 (98-99%) 表明只有 1-2% 的信号由于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。同时该方法具有高准确度 (目标物浓度的  $\pm 10\%$  之内) 和极好的精密度 (CV < 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进行修改。安捷伦科技可提供电子版的 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://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/cn](http://www.agilent.com/chem/cn).
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) Opiates (morphine and codeine) in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS). SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5875EN.
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 (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 benzoylecgonine. *Journal of Analytical Toxicology*, 33: 398-408.
8. P. Wang, J. A. Stone, K. H. Chen, S. F. Gross, C. A. Haller, and A. H. Wu (2006) Incomplete recovery of prescription opioids in urine using enzymatic hydrolysis of glucuronide metabolites. *Journal of Analytical Toxicology*, 30: 570-575.

## 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13日，中国印刷  
5990-9625CHCN