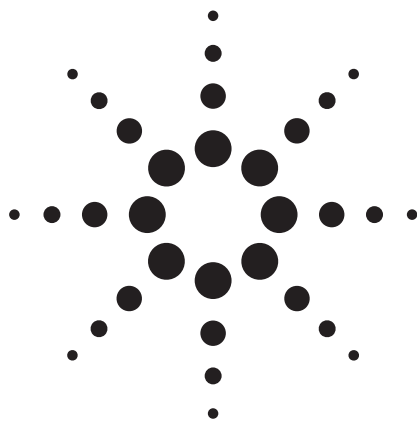


# 苯丙胺类药物的苯甲酰化提取和 LC/MS/MS 定量分析



应用

法庭科学

## 作者

Neil Campbell, B. Sc.  
化学中心(WA), 法庭科学实验室  
125 Hay Street  
East Perth, Western Australia  
澳大利亚

Michael Zumwalt  
安捷伦科技公司  
9780 S. Meridian Blvd.  
Englewood, CO 80112  
美国

## 摘要

本文报导了一种用 Agilent G6410A 三重串联四极杆质谱仪 (QQQ) 确证苯丙胺类药物是否存在的快速、灵敏、并经过验证的技术。方法在 15 到 1,000 ng/mL 范围内呈良好线性。本研究中所分析的苯丙胺类药物包括血液中的苯丙胺、甲基苯丙胺、甲撑二氧苯丙胺(MDA)和亚基双氧甲基苯丙胺 (MDMA)。这些药物的制备采用提取烷基化技术, 样品制备后经反相 LC/MS/MS 测定, 采用 1.8  $\mu\text{m}$  粒度 C18 柱进行高分离度的快速分离。待测物和内标的洗脱时间均短于或等于 3.6 分钟。

## 前言

苯丙胺是一类对中枢神经系统有强兴奋作用的拟交感胺类药物。苯丙胺是这类药物的母体药物, 其它均在结构上与之相关。该系列的其它药物还包括: 麻黄碱、伪麻黄碱、甲基苯丙胺、苯丁胺、氟苯丙胺、对氯苯丁胺、MDA 和 MDMA (摇头丸)。本研究中所用的 LC/MS/MS 方法可以对死前和死后血液和尿样, 以及死后肝脏及内脏样品中的苯丙胺类药物进行定量分析。一级和二级脂肪胺在碱性条件下与五氟苯甲酰氯反应, 生成各自的酰胺。本方法利用这一反应和提取烷基化的原理, 分离这些药物在血液或尿液中形成的产物。

这些药物的定量采用的是电喷雾液相色谱/串联质谱, 多反应监测法 (LC/MS/MS-MRM)。每种药物分析物都监测一个定量离子, 用于定量, 每种分析物都监测一个另外的子离子进行确证, 称为确认离子。将确认离子与定量离子的总离子比定为方法测定值, 用以确证所有样品中是否存在这些化合物。这一比值的确认允差为  $\pm 20\%$ 。



Agilent Technologies

对于相应的 D5 内标, 因为不需要确证, 所以只监测定量离子。

这些化合物的结构见图 1。

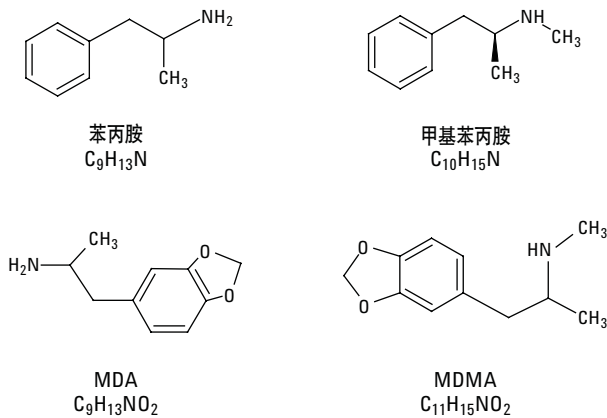


图 1. 本研究中所分析化合物的结构

## 实验

### 试剂(Sigma-Aldrich, Castle Hill, NSW, Australia)

1. 5% 五氟苯甲酰氯(PFBCl) (将 0.25 mL PFBCl 加入 5 mL 氯丁烷中)
2. 三乙胺/环己烷(TEA/CH) (将 0.5 mL TEA/CH 加入 500 mL 量筒中, 滴加环己烷使终体积为 500 mL, 混合, 使两相分离)
3. 氨缓冲液 (烧杯中加入 100 mL 水, 溶解氯化铵至得到饱和溶液。用浓氨水调节 pH 至 9.4。)
4. 无水硫酸钠

### 标样 (Cerilliant, Round Rock, TX, USA)

1. 目标药物的固体标样溶于甲醇制成标准参考溶液。各化合物之间的实际量稍有不同, 将在后面报告

的浓度范围中有所反映。标准用甲醇稀释, 加入血液中, 使浓度范围达到约 15 到 1,000 ng/mL

2. 内标 -10  $\mu\text{g/mL}$  D5-苯丙胺、D5-甲基苯丙胺、D5-MDMA 和 D5-MDA 混合物。标准品购自生产厂商, 安瓿封装, 1 mL 甲醇中各含 100  $\mu\text{g}$  药物
3. 按预测的浓度范围将标样加到血液中, 测定响应因子。相应的血液浓度为 0.05、0.1、0.25、0.5 和 1  $\mu\text{g/mL}$ 。每批分析必须含空白

### 样品制备

1. 将 0.2 mL 血液加至 15 mL 一次性试管中, 用 1 mL 水稀释。加入 5 mL 含有 D5-苯丙胺混合标样的 TEA/CH 溶液(使浓度达到 50 ng/5 mL)、0.2 mL 氨溶液和 0.01 mL 新配制的 5% PFBCl 溶液。或者, 用自动稀释器(Hamilton Microlab Series 500) 0.2 到 1 mL 稀释程序, 也可以更方便地对血液取样和稀释
2. 标准参考溶液的处理同上, 将 0.2 mL 空白血加到稀释的标样中
3. 涡旋混合 3 分钟, 60 °C 加热 10 分钟, 并离心 (见注 4)
4. 去除有机相, 使其通过填充无水硫酸钠的巴斯德吸管进行干燥, 并蒸干
5. 用 100  $\mu\text{L}$  甲醇复溶后, 移至自动进样器微量样品管中, 盖封, 用 LC/MS/MS-MRM 进行分析

### 注:

1. 前述的内标量相当于 250 ng/mL, 相应的浓度范围为 10 到 1000 ng/mL。
2. 如果没有氘代类似物, 为分析物选择的内标必须与其化学性质相匹配, 即, 伯胺使用伯胺, 仲胺使用仲胺。

3. 涡旋混合时可能出现乳化，用巴斯德吸管搅拌，并重新离心，即可破乳。
4. 苯丙胺、甲基苯丙胺、MDMA、MDA 反应时不需要加热，如果还要对麻黄碱进行测定，则必须包含加热步骤。

### LC/MS/MS 仪器

本工作所用的 LC/MS/MS 系统包括：Agilent 1200 系列真空脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱、Agilent G6410A 三重串联四极杆质谱仪(QQQ)和 G1948B 电喷雾离子源(ESI)。用 Agilent MassHunter B.01.01 软件进行系统控制和数据处理。液相色谱和质谱的详细条件如下。

### LC/MS 方法

#### LC 条件

色谱柱: Agilent ZORBAX XDB-C18, 4.6 x 50 mm, 1.8  $\mu$ m (部件号 922975-902)

柱温: 60  $^{\circ}$ C

流动相: A = 氨缓冲液 (pH = 9), 见试剂  
B = 甲醇

流速: 0.7 mL/min

梯度:

时间 (时间)	%B
0 – 0.2	50
3.0 – 4.0	100 后运行时间 = 1 分钟
4.1 – 6.0	50

进样体积: 2  $\mu$ L

#### MS 条件:

模式: Agilent G1948B 离子源 ESI 正离子化模式

喷雾器: 50 psig

干燥气流量: 6 L/min

干燥气温度: 350  $^{\circ}$ C

$V_{cap}$ : 4000 V

Q1 分辨率: 单位, 0.7 amu (FWHM)

Q2 分辨率: 单位, 0.7 amu (FWHM)

MRM 设置见表 1。注意，各 MRM 的裂解电压和停留时间都是固定的，分别为 140 V 和 40 毫秒。

表 1. 本工作中所分析化合物的 MRM 设置 (用于确证的确认离子也在括号中显示)

化合物	母离子	子离子 (确认离子)	碰撞能量
苯丙胺	330	119 (91)	15
D5-苯丙胺	335	124	15
甲基苯丙胺	344	119 (91)	15
D5-甲基苯丙胺	349	121	15
MDMA	388	163 (135)	20
D5-MDMA	393	165	20
MDA	374	163 (135)	20
D5-MDA	379	168	20

### 结果与讨论

图 2a 到 2d 显示了各化合物从 15 到 1,000 ng/mL 范围的线性。注意，进行了二次曲线拟合，这里没有权重，未过原点。所有 4 条拟合曲线的相关系数均大于 0.999。从图 2a 到 2d 可见，二阶系数均小于 0.007，对线性拟合的影响很小，得到的曲线对所有测定来说可以认为是线性的。

要确证是否存在某种化合物，其确认离子和定量离子的峰面积之比必须符合方法开发时得到的理论值，允差在  $\pm 20\%$  范围内。批内的所有样品，包括校正样品和质控 (QC) 样品，都必须符合这一标准，否则视为阴性。

每个化合物的离子比值确认实例见图 3a 到 3d。

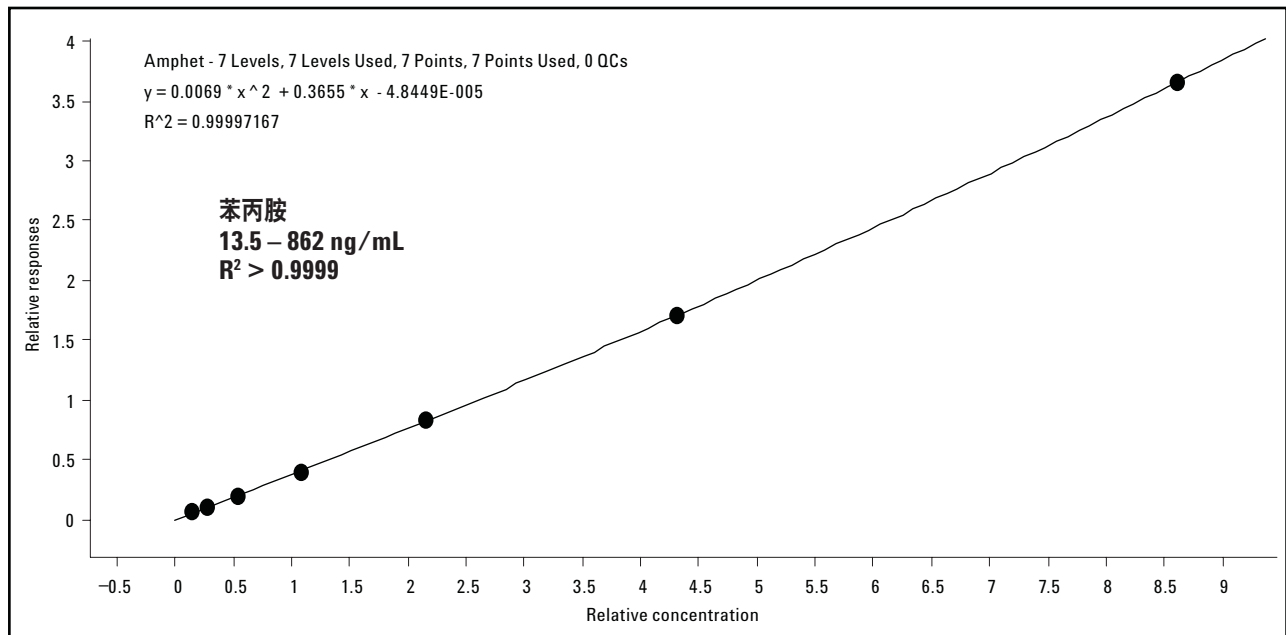


图 2a. 血中苯丙胺的线性

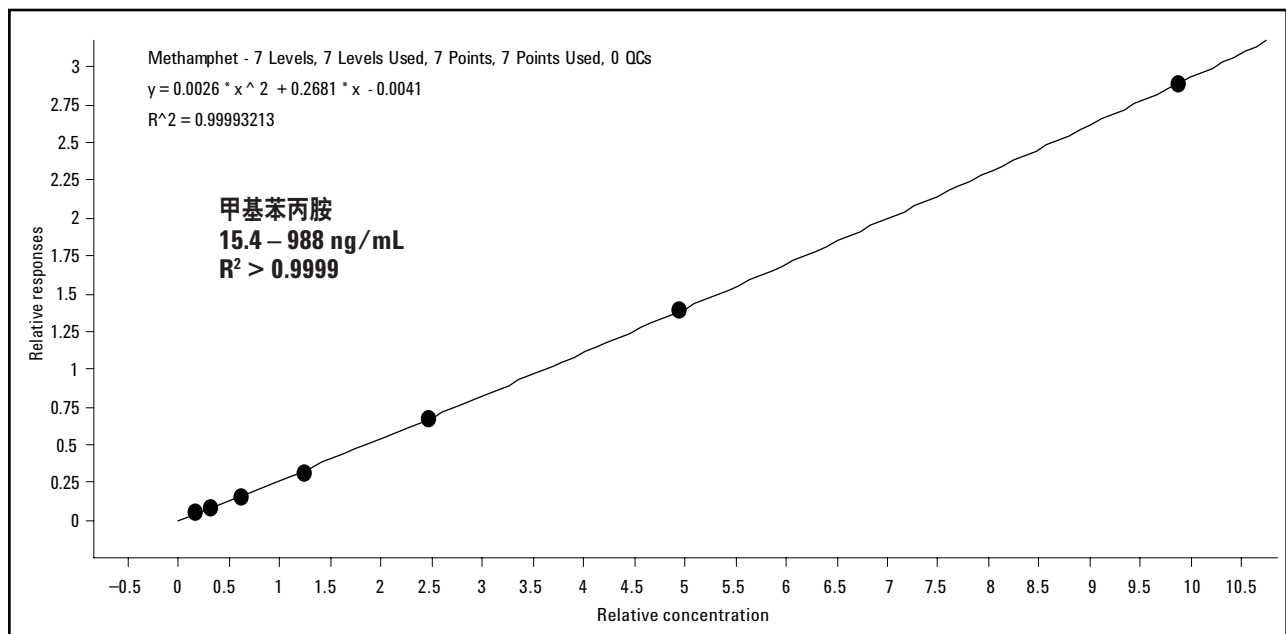


图 2b. 血中甲基苯丙胺的线性

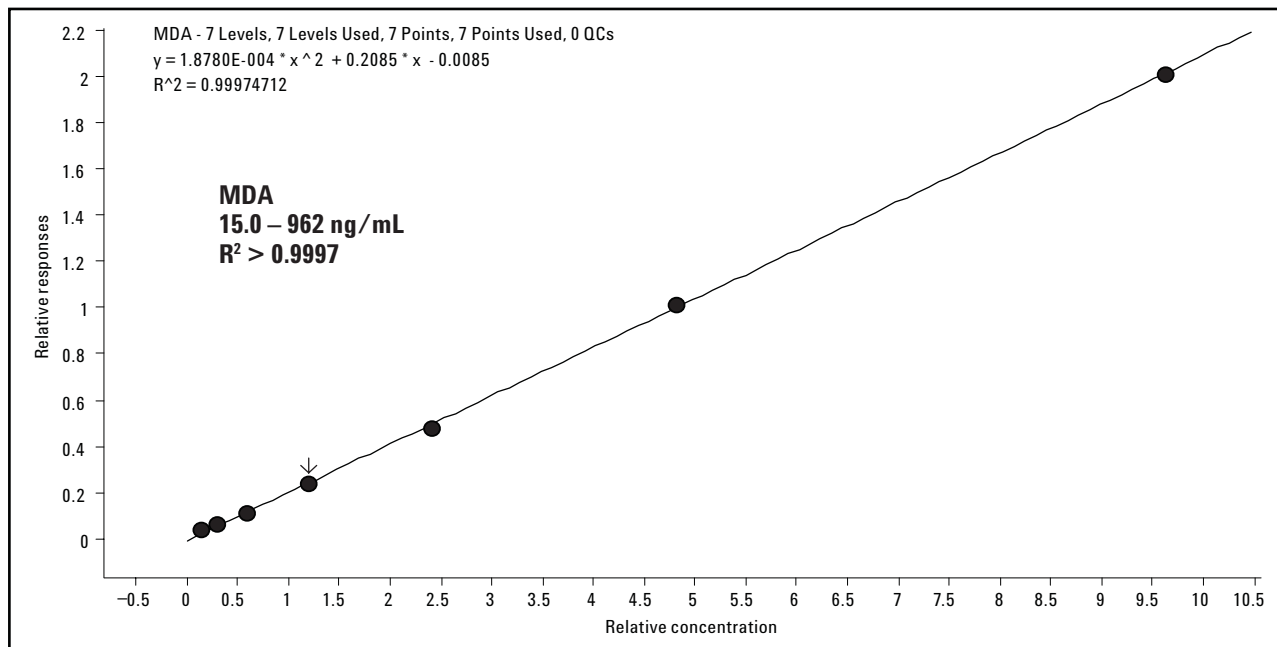


图 2c. 血中 MDAL 的线性

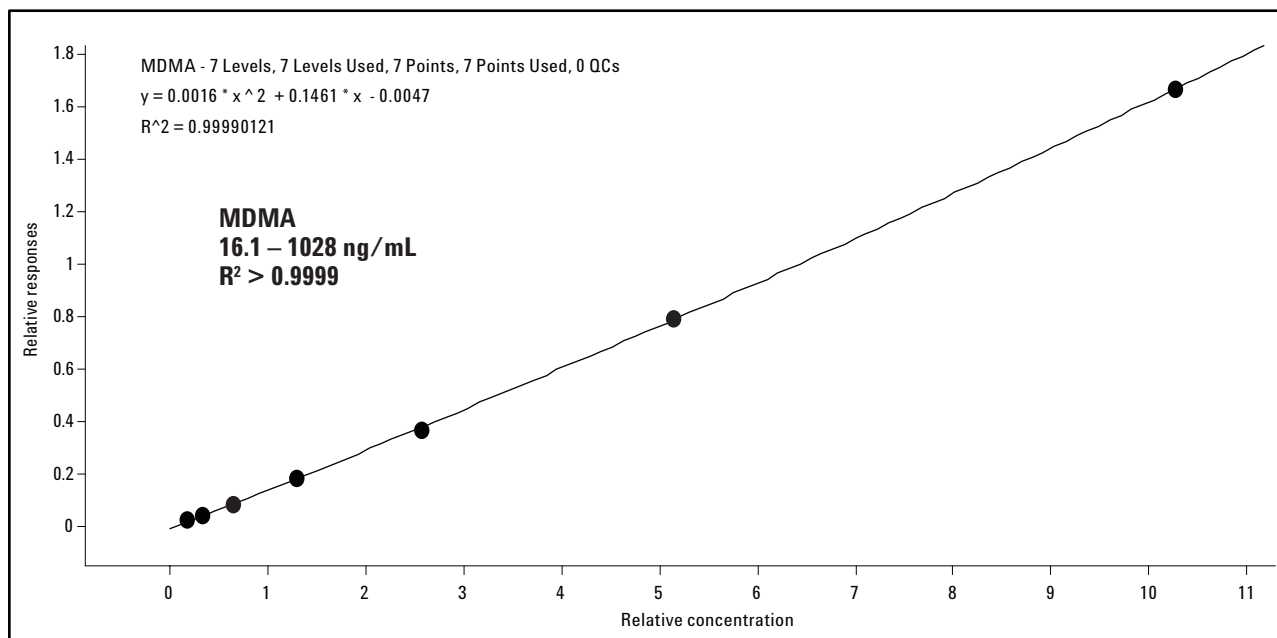


图 2d. 血中 MDMA 的线性

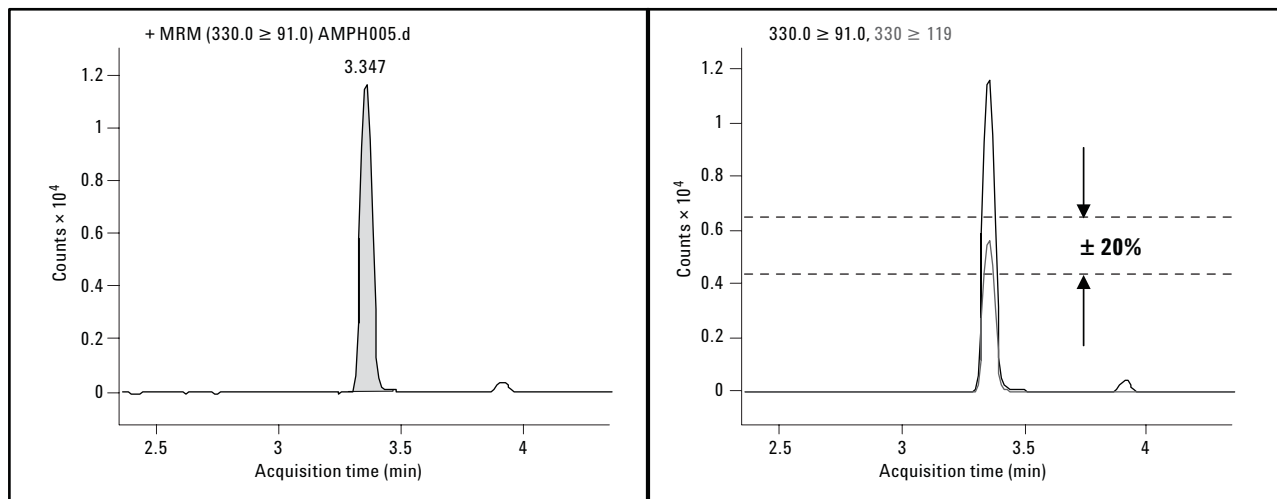


图 3a. 血中苯丙胺的离子比值确证。注：保留时间为 3.35 分钟

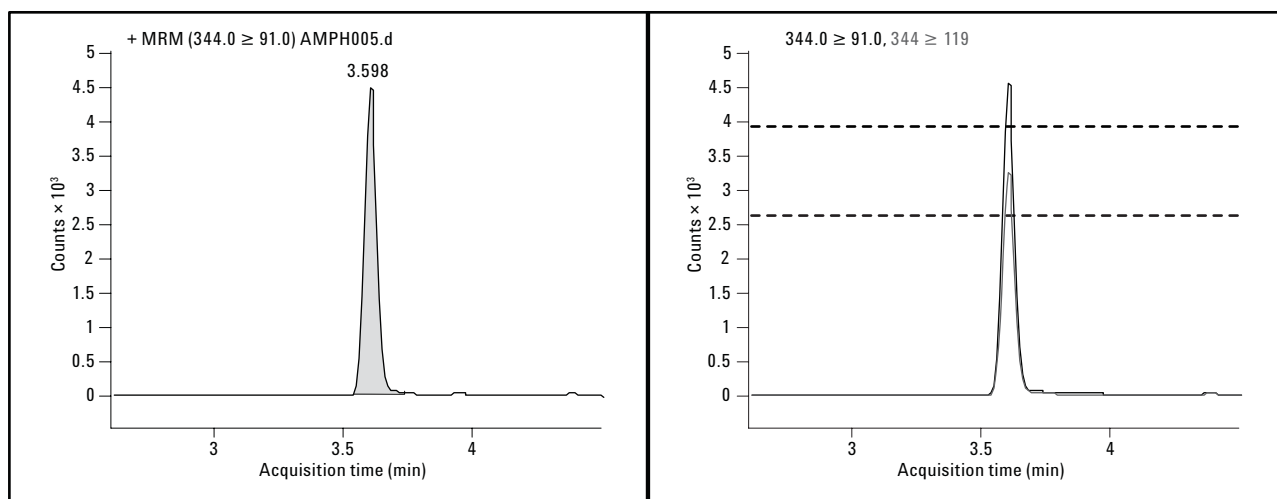


图 3b. 血中甲基苯丙胺的离子比值确证。注：保留时间为 3.60 分钟

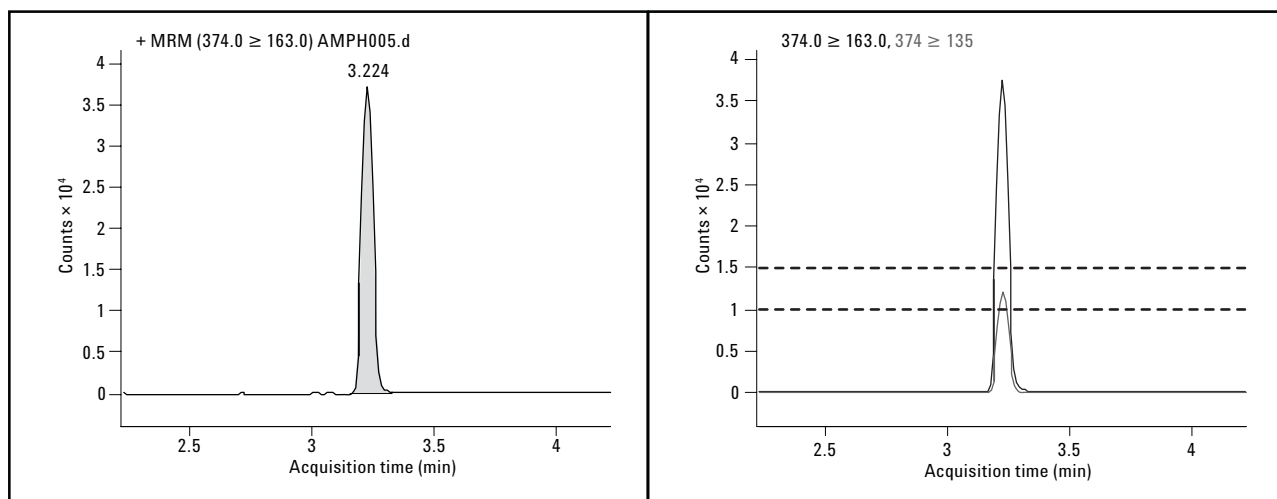


图 3c. 血中 MDA 的离子比值确证。注：保留时间为 3.22 分钟

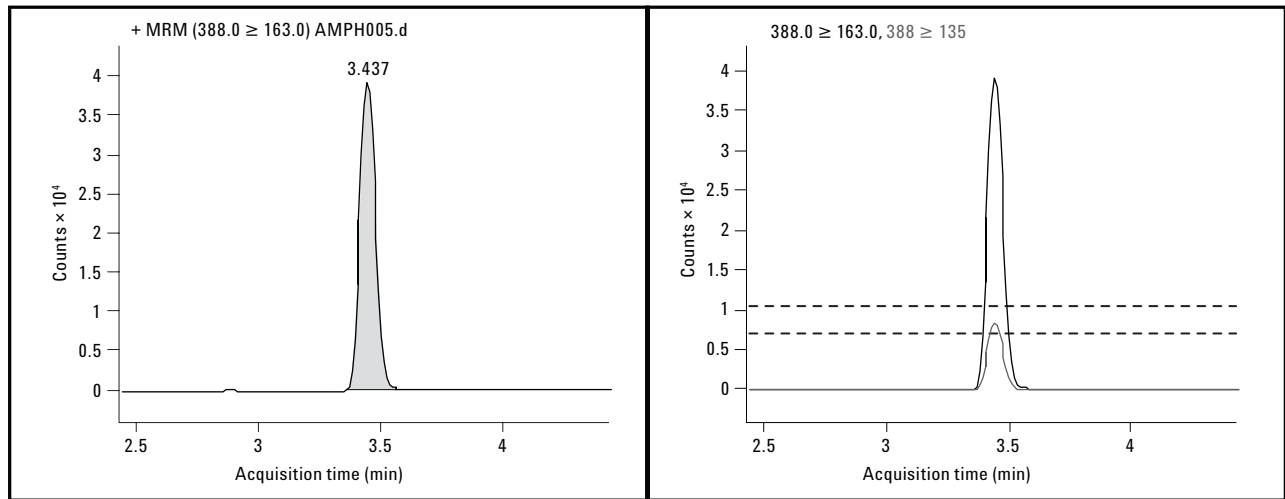


图 3d. 血中 MDMA 的离子比值验证。注：保留时间为 3.44 分钟

我们还考察了血中两个不同浓度水平苯丙胺(amp) 和甲基苯丙胺(meth)的重现性。结果列于表 2a 和 2b, 血液浓度分别为 0.5 和 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 各进样 10 次。结果显示, 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  苯丙胺和甲基苯丙胺相对于 D5 内标的峰面积相对标准偏差(%RSD)分别为 0.48 和 0.89, 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度水平的峰面积相对标准偏差分别为 1.12 和 2.27。

### 验证

1. 本方法采用的是一个已发表的验证方法和一个经过广泛验证的“内部”GC-MS 方法。用 LC/MS/MS-MRM 检测是一项不需要再验证的确定技术。
2. 每次分析之间的精密度已通过重复进样的统计分析进行了测定。

表 2a. 苯丙胺和甲基苯丙胺在 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  血液浓度水平时的重现性

进样次数	苯丙胺峰面积 (area cts*1000)	D5 苯丙胺峰面积 (area cts*1000)	相对响应	甲基苯丙胺峰面积 (area cts*1000)	D5 甲基苯丙胺峰面积 (area cts*1000)	相对响应
1	918	1844	0.498	1060	1600	0.663
2	933	1887	0.494	1077	1599	0.674
3	938	1875	0.500	1087	1620	0.671
4	949	1904	0.498	1076	1627	0.661
5	948	1909	0.497	1082	1648	0.657
6	949	1911	0.497	1081	1641	0.659
7	967	1924	0.503	1109	1650	0.672
8	980	1963	0.499	1132	1689	0.670
9	986	1969	0.501	1128	1678	0.672
10	1006	2011	0.500	1145	1720	0.666
		标准偏差	0.002		标准偏差	0.006
		%RSD	0.484		%RSD	0.889

表 2b. 苯丙胺和甲基苯丙胺在 0.25 µg/mL 血液浓度水平时的重现性

进样次数	苯丙胺峰面积 (area cts*1000)	D5 苯丙胺峰面积 (area cts*1000)	相对响应	甲基苯丙胺峰面积 (area cts*1000)	D5 甲基苯丙胺峰面积 (area cts*1000)	相对响应
1	236	966	0.244	167	515	0.324
2	243	957	0.254	173	506	0.336
3	247	972	0.254	173	513	0.342
4	246	972	0.253	166	518	0.324
5	246	973	0.253	175	516	0.338
6	245	978	0.251	173	514	0.335
7	250	994	0.252	176	512	0.342
8	248	989	0.251	178	526	0.348
9	254	1004	0.253	175	536	0.333
10	253	1005	0.252	179	536	0.334
		标准偏差	0.003		标准偏差	0.008
		%RSD	1.126		%RSD	2.270

- 用本方法成功分析了已知浓度的苯丙胺和甲基苯丙胺商用质控样品，和实验室间熟练水平测试样品。
- 空白血和尿中加入一定浓度的苯丙胺标样，对其进行分析建立校正曲线。结果显示，方法在 15 到 1000 ng/mL 浓度范围内呈线性。对于大于或小于这一范围的结果，将报告为“大于”或“小于”。或者报告该结果为近似值，或扩展标样范围使其包含该浓度，再对样品重新进行分析。
- 通过质控数据和精密度考察测定方法的不确定度为 10% (95% 置信度)。

## 结论

本文报道的 LC/MS/MS 方法可用非常短的分析时间，对全血中的多种滥用药物进行快速确证和定量。多反应监测的几个碎片离子不仅用作定量离子，也作为确认离子。用 1.8 µm 粒径的安捷伦 C18 柱获得了极高分离度和良好峰形，使用 4.6 mm 内径色谱柱和 ESI 接口时，采用了 700 µL/min 较高的流速。在苯丙胺和甲基苯丙胺 0.5 µg/mL 的血液浓度下，达到了 1% RSD 相对响应。

## 致谢

特别感谢安捷伦同事 John M.Hughes 给予宝贵的评论和意见。

## 更多信息

如果需要进一步了解我们的产品和服务，请访问我们的网站 [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)。

了解本应用报告更详细信息，请与安捷伦科技公司的 Michael Zumwalt 联系。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和规格，如有变更，恕不另行通知

© 安捷伦科技公司，2007 年

2007 年 10 月 25 日中国印刷  
5989-7527CHCN

