

液相色谱/三重串联四极杆质谱用于滥用药物的快速检测

应用

法医分析

作者

Michael C. Zumwalt, PhD
Agilent Technologies, Inc.
Englewood, CO
USA

Christine Moore, PhD
Immunoanalysis, Corp.
Pomona, CA
USA

摘要

本文介绍了 Agilent 6410AA 三重串联四极杆质谱仪用于唾液中滥用药物的快速检测，本方法具有灵敏度高及重复性好的特点。三重串联四极杆质谱的灵敏度非常容易满足美国滥用物质和精神健康服务局 (SAMHSA) 的检测限量要求。本文中分析的滥用药物包括四氢大麻酚，可卡因，安非他命和甲基安非他命和二亚甲基双氧安非他命 (MDMA)，样品来源主要是唾液，样品在分析之前用固相萃取 (SPE) 进行净化。净化的样品用反相液相色谱/质谱/质谱及 1.8 微米的 C18 色谱柱进行高分离快速色谱分析。结果目标化合物和内标物的保留时间都很短，大麻酚的保留时间小于 4.2 分钟，其它的化合物的保留时间均小于 1.5 分钟。本方法成功地用于质量控制的定量分析中。

前言

在 2004 年，美国 SAMHSA 建立了新的标准，它将允许联邦调查局在调查中使用汗液，唾液和头发，而目前只使用尿液 [1]。目的是将唾液作为测试基质用于检测工作地点的人们体内的滥用药物水平，而且可以扩展至警察局的检测点的测试以检测是否有滥用药物。

采用液相色谱/质谱/质谱确认唾液中滥用药物可以提供比气质方法更快的分析方法，因为液质不需要衍生化。采用 1.8 微米的 C18 色谱柱的液相色谱可以在高流速条件下，获得分离度高而对称的峰形。三重串联四极杆的多反应监测 (MRM) 功能可以对共流出峰和内标化合物进行高选择性的 MS/MS 检测，同时可以用高丰度的特征离子进行定量分析，而其它低丰度的离子作为确认离子用于确认。多反应监测 (MRM) 可以对复杂基质如，唾液样品的滥用药物进行高特定性的检测。

在本实验中，五个滥用药物在两个不同的分析中进行，四氢大麻酚 (THC) 的保留时间小于 4.2 分钟，可卡因，安非他命，甲基安非他命和 MDMA 的流出时间小于 1.5 分钟。方法检测限远远低于 SAMHSA 设定的检测限量。相应的阈值列于表 1 中。



Agilent Technologies

表 1. SAMHSA 规定的滥用药物的最低要求限量

滥用药	检测限量 (ng/mL 唾液)
THC	2
可卡因	8
安非他明	50
甲基安非他明	50
MDMA	50

实验条件

样品处理

对于每一个样品，用 FDA 认可的收集装置 (Quantisal™) 取 1 毫升的唾液，然后溶解于 3 毫升的缓冲液中。取其中 1 毫升进行进一步的分析，这相当于 250 微升的唾液。对于质量控制 (QC) 样品，含有标准物的标准溶液加入到空白唾液样品中，同时加入每种滥用药的中等浓度和低浓度的内标。对于未知样品，只加入内标化合物，而对于校正曲线的建立，用萃取之后的基质加入不同浓度的标准化合物和内标。

样品提取方法与气质方法一样，只是去除了衍生化以及最后用流动相定容，而不是传统的气相色谱用的溶剂。

在唾液/缓冲液中，加入 2 毫升 0.1 M 磷酸钾缓冲液，然后涡旋振荡。固相萃取色谱柱（部件号：691-0353T, SPEWare, San Pedro, CA），用 0.5 毫升甲醇（用于 THC），3 毫升甲醇（用于可卡因），然后用 100 微升的 0.1 M 醋酸（用于四氢大麻酚），以及 2 毫升 0.1 M 磷酸（可卡因）老化。在固相萃取柱上，加载样品，然后用甲醇，去离子水，然后用 98:2 的正己烷:醋酸（洗脱四氢大麻酚，THC），78:20:2 的 CH₂Cl₂:异丙醇:氨水的（洗脱可卡因）或者用 2% 的氨水的乙酸乙酯用于甲基安非他命，甲基安非他明和 MDMA。

样品吹干之后，重新溶解于液相的流动相中（0.1% 的甲酸水溶液）。对于校正标样、目标化合物和内标溶解于 1 毫升的流动相中。

注意本研究的目标是测试三重串联四极杆质谱仪的能力，而不是萃取过程的质量，因此，决定萃取后，在标样和内标中加入空白唾液提取液，以消除样品回收率的变化。然而在萃取前，在目标化合物和内标中加入了质量控制样品，因此在萃取前，在未知样品中只加入内标。

分析的化合物

目标化合物结构的分子离子的信息参见图 1

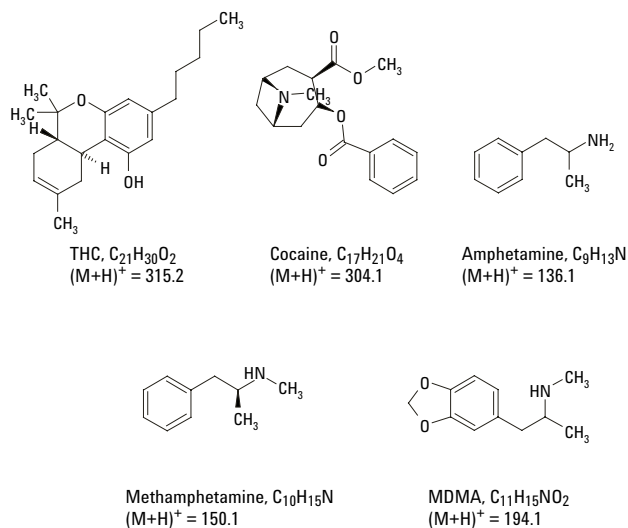


图 1. 目标化合物结构的分子离子

液相色谱/质谱/质谱仪

本研究使用的液质联用系统包括安捷伦 1100 系列的真空脱气机，二元泵，多孔板自动进样器，柱温箱和带电喷雾离子源的 G64100AA 的三重串联四极杆质谱。系统控制和数据分析由 Agilent QQQ 控制（研发版）、定性和定量数据分析软件进行控制。详细的液相色谱和质谱条件参见下面的表中。

本方法的目标是建立快速而灵敏的检测方法用于唾液中滥用药物的定量及确认分析。对于提高分析速度的同时，保证高分离度和峰对称性。经过条件优化，只要乙腈和含甲酸的水就可以将所有的化合物分离得很好。对于 1.8 微米色谱柱，采用小于 1 分钟快速梯度条件就可分离所有的化合物。分析速度优于气质和传统的液质方法。

液相色谱条件

色谱柱:	Agilent ZORBAX SB-C18, RRHT, 2.1 x50 mm, 1.8 μ m (部件号 822700-902)
色谱柱温度:	40 °C
流动相:	A = 含 0.1% 的甲酸的水溶液 B = 含 0.1% 的甲酸的乙腈溶液
流速:	0.5 mL/min
梯度:	0 分钟, 5% B 1 分钟, 95% B 6 分钟, 95% B 后运行时间 = 2.5 分钟
进样体积:	80 微升 (THC); 20 微升 (可卡因及其它)

质谱条件

离子化模式:	电喷雾正离子模式 (Agilent G1948A 离子源)
雾化器:	40 psig
干燥气流速:	5 L/min
干燥气温度:	350 °C
V _{cap} :	4000 V
Q1 分辨率:	0.7 amu
Q2 分辨率:	0.7 amu
碰撞能量:	23 V (THC); 5 V (对于其它的化合物)
MRM:	4 transitions 用于 THC; 16 transitions 用于可卡因, 安非他明, 甲基安非他明和 MDMA 详细说明参见表 2

液相色谱/质谱方法描述

通过直接进样的方式 (每个标样的浓度为 1 ng/uL) 进行 MRM 模式的优化, 从而得出最佳的定性和定量离子。取丰度最高的离子作为定量离子以及第二强的离子作为确认离子。

在作此应用时, 测试版的软件只允许设定一个碰撞能量和一个时间编程。23 V 用于四氢大麻酚和内标, 5 V 用于可卡因和内标。除此之外, 在整个分析中连续采集 MRM 数据。结果表明, 数据结果满足 SAMHSA 的要求, 如果进一步优化碰撞能量和利用时间编程功能, 其灵敏度会更高。

表 2. 用于多反应监测 (MRM) 的采集参数

化合物	保留时间 (min)	准分子 离子 (M+H) ⁺	定量 离子 (m/z)	确认 离子 (m/z)
四氢大麻酚	4.2	315.3	193.1	295.1
氘代-四氢大麻酚	4.2	318.3	196.1	262.1
可卡因	1.5	304.1	182.0	82.0
氘代-可卡因	1.5	307.1	185.1	85.1
安非他明	1.3	136.1	93.0	119.0
氘代-安非他明	1.3	141.1	93.0	124.0
甲基安非他明	1.3	150.1	91.0	119.0
氘代-甲基安非他明	1.3	155.1	92.0	121.0
MDMA	1.4	194.1	163.0	135.0
D5-MDMA	1.4	199.1	165.0	135.0

分析结果和讨论

图 2 所示为浓度为限量一半，即 1 ng/ml 的四氢大麻酚的色谱图。这个浓度水平相当于柱上进样量为 20 pg。三针进样的精密度是 3.6%。RMS 的信噪比一般相当于传统的信噪比的 5 倍。结果显示信噪比是 32:1。定量限 0.5 ng/mL。

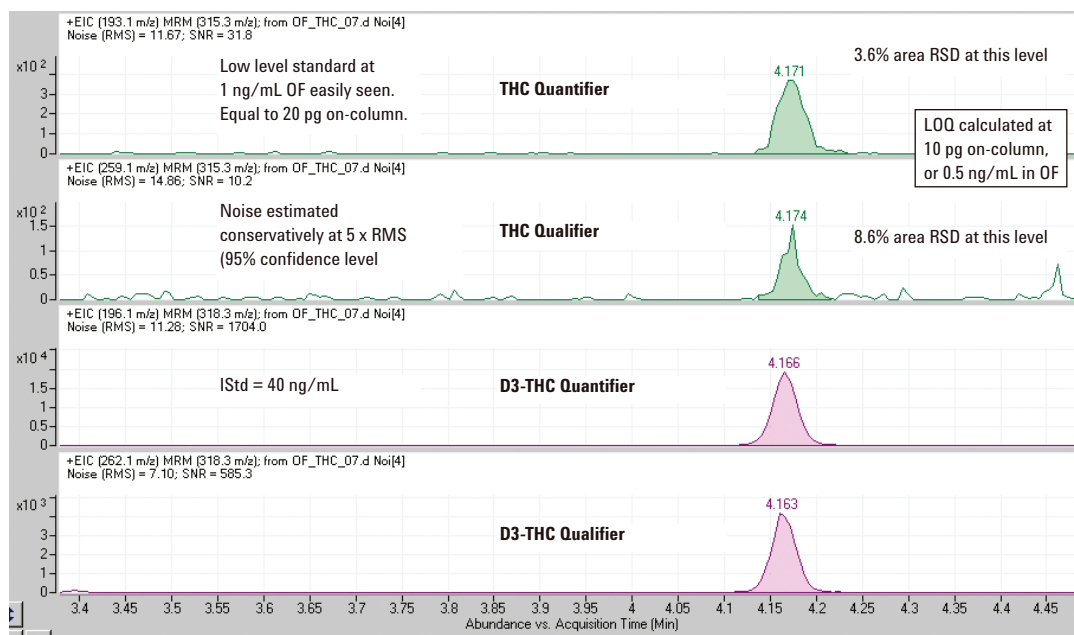


图 2. 四氢大麻酚 (THC) 和氘代-大麻酚 (D3-THC) 的子离子流图。安捷伦定性分析软件可以自动生成 色谱图并对 色谱峰进行积分。所有的峰的保留时间小于 4.2 分钟。

在图 3 中，用与处理 THC 一样的参数分析其它的化合物，可卡因，MDMA，安非他明，甲基安非他明在唾液中的定量限分别为 0.2，0.5，0.6 和 2.5 ng/ml。

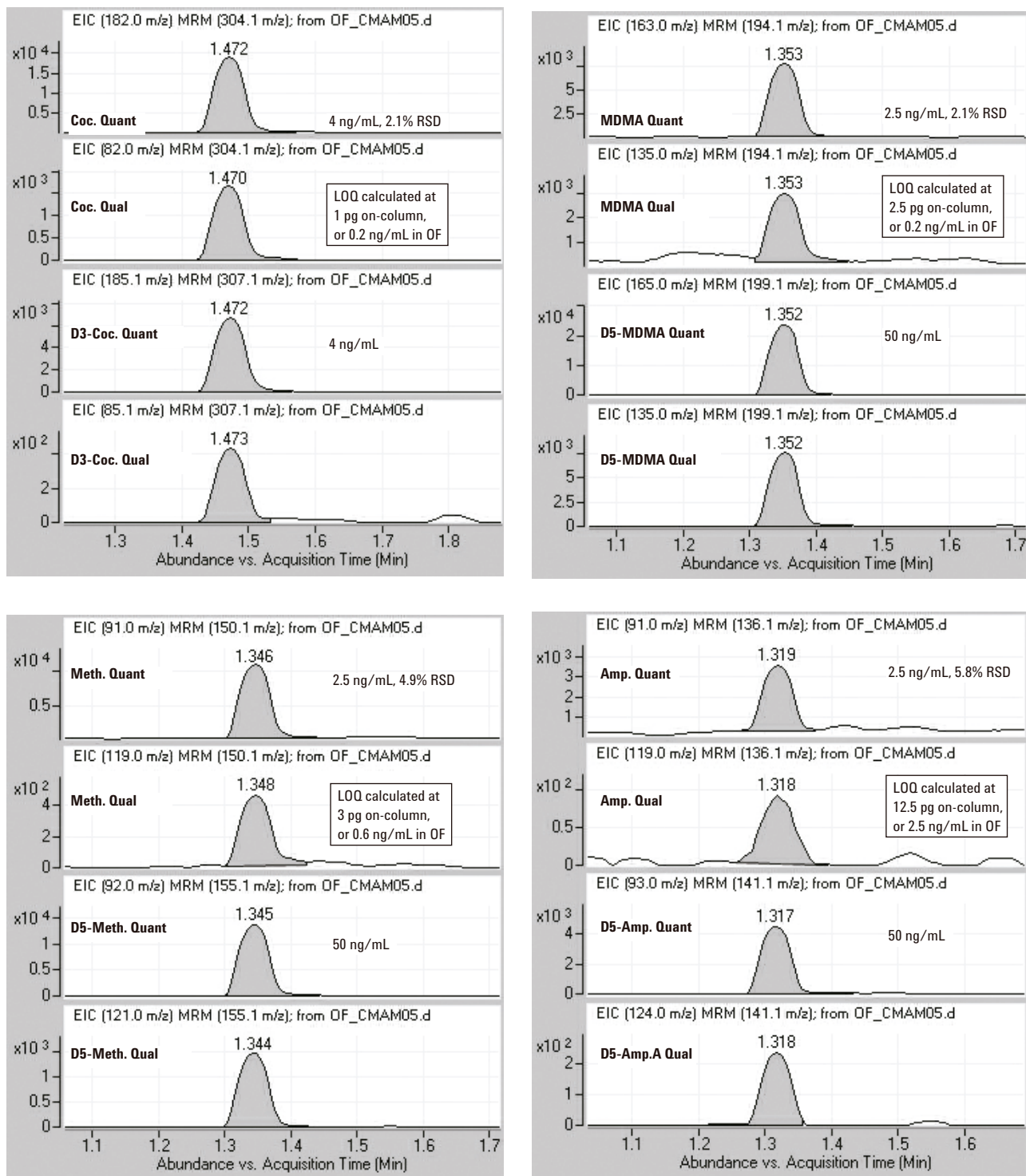


图 3. 含可卡因，氘代-可卡因，MDMA，D5-MDMA，安非他明，D5-安非他明，甲基安非他明，D5-甲基安非他明的最低含量标样的子离子流图。所有的峰的保留时间小于 1.5 分钟。

尽管对于每一个化合物都有定量离子和相应的内标化合物，同时也包括确认离子，可以参见图 4。对于每个确认离子的要求是检查测量的离子比例是否落在规定的范围内。例如，对于大麻酚 (THC)，在 Agilent 64100AA 的液质联用上，测量的与定量离子的比例应该是 22%。设定的窗口的范围是 $\pm 20\%$ ，总的范围是 17.6% 到 26.4%。只要比例落在这个范围内，就说明满足确认的指标要求。对于所有的四氢大麻酚化合物，

校正曲线和质量控制样品，这个指标都满足要求。同样的指标用于内标化合物。

对于其它的化合物，离子比例对于可卡因，MDMA，安非他命，甲基安非他命分别为 4%，9%，95% 和 26%。和 THC 一样，也建立了相应的内标的指标值。所有的校正曲线和质量控制样品皆满足这些指标要求。

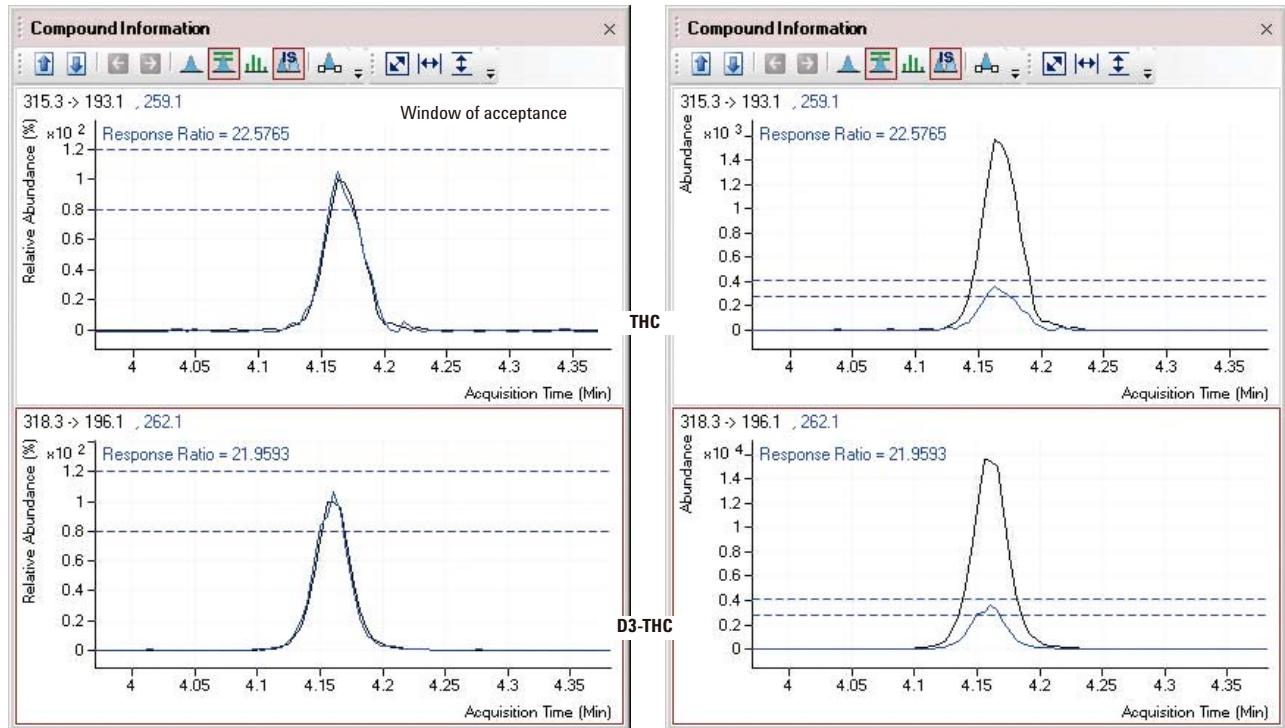
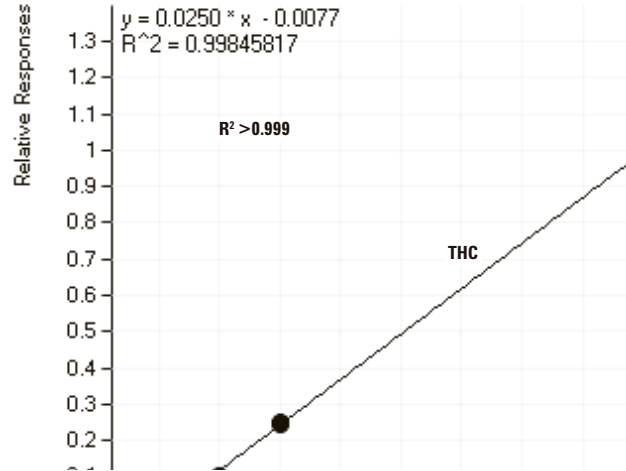


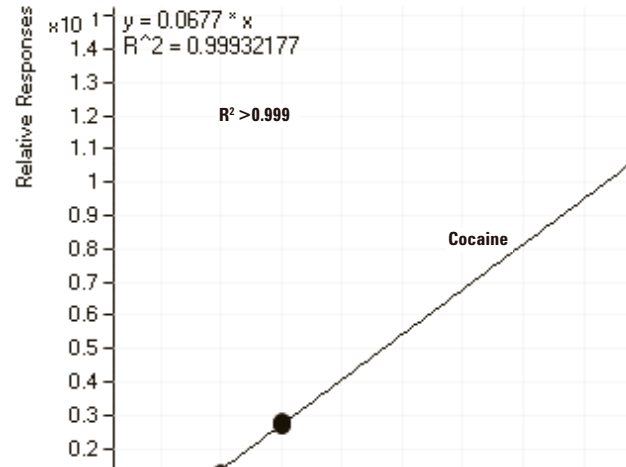
图 4. 对于四氢大麻酚 (THC)，确认离子比例是 22%，应该落在 $\pm 20\%$ 内，或者 17.6%-26.4% 之间。有两种方法显示确认的结果。一是左图所示，面积归一化，另一种（右图）是不归一化，两种方法都显示了确认离子与定量离子的重叠谱图。如果离子比例超出规定范围，积分的面积峰就会以蓝色的阴影表示，否则就会以透明的表示。

所有化合物的校正曲线参见图 5 所示。最保守的曲线拟合参数用于校正曲线的建立，即没有权重也没有过原点。每一条校正曲线的浓度范围都在两个数量级左右。

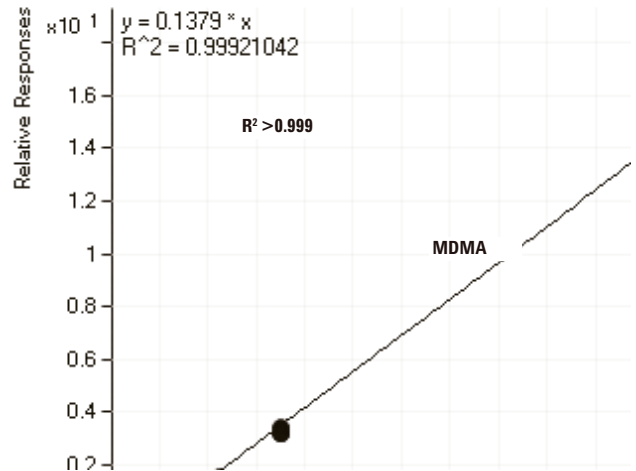
THC-d0 - 7 Levels, 7 Levels Used, 17 Points, 17 Points Used



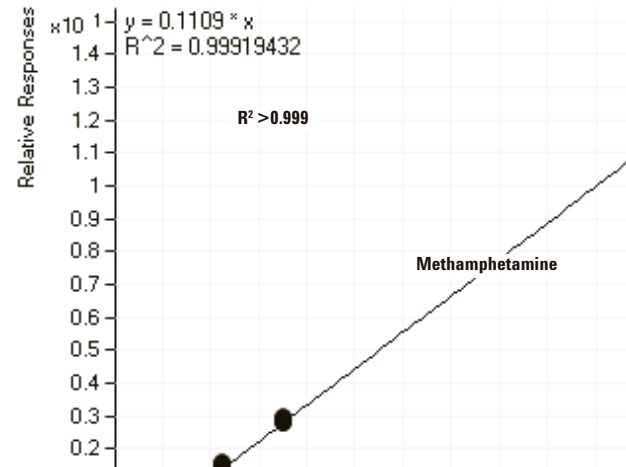
Cocaine-d0 - 5 Levels, 5 Levels Used, 15 Points, 15 Points Used



MDMA-d0 - 5 Levels, 5 Levels Used, 15 Points, 15 Points Used



Meth-d0 - 5 Levels, 5 Levels Used, 15 Points, 15 Points Used



Amp-d0 - 5 Levels, 5 Levels Used, 15 Points, 15 Points Used

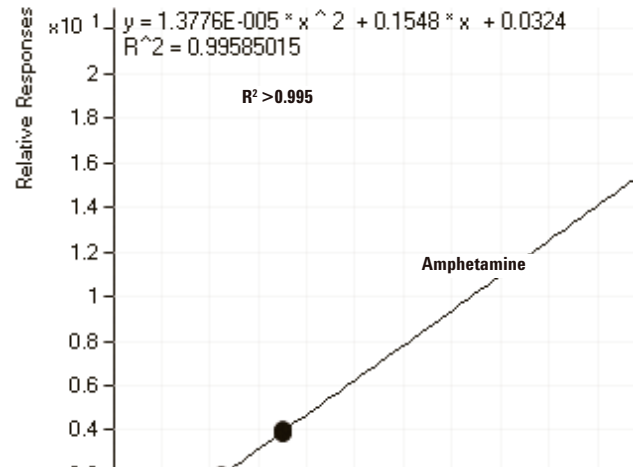


图 5. 使用不过原点及没有权重的线性拟和建立每一个化合物的校正曲线

四氢大麻酚的重复性数据结果参见表 3，对于高浓度的样品，相对标准偏差 (%RSD) 相对较低。用三次进样的结果计算相对标准偏差 (%RSD)。

表 3. 四氢大麻酚的重复性结果

浓度水平 (ng/ml 唾液)	% RSD
1	3.6
2	2.5
5	2.3
10	1.0
50	1.7

根据校正曲线计算的质量控制样品和未知样品的分析结果参见表 4 中。表中同时显示了酶联免疫和气质法分析的结果。

表 4. 控制样品和未知样品的分析结果

样品	理论 浓度 (ng/mL)	测量 浓度 (ng/mL)	准确度 (%)
四氢大麻酚 QC1	2	1.81	9.5
四氢大麻酚 QC2	5	4.21	16.0
四氢大麻酚, 未知	10*	9.39	6.1
可卡因 QC1	8	7.51	6.1
可卡因 QC2	8	7.68	4.0

* 是用气质方法测定的

进一步的工作

其它的研究表明，对于四氢大麻酚 (THC) 的检测，使用大气压化学电离源 (APCI)，甚至是大气压光离子化源 (APPI) 的得到的灵敏度比电喷雾高 [2]。使用大气压化学电离源 (APCI) 和使用组合源即 Agilent G1978A 组合源 (包括 ESI 和 APCI) 分析滥用药物，在头两分钟，用电喷雾离子化，分析可卡因，MDMA，安非他命和甲基安非他命，然后切换至大气压化学电离源 (APCI) 分析四氢大麻酚 (THC)。

正如前面提到的，可以对每一个多反应监测的碰撞电压进行优化，以获得更高的灵敏度。对于 6410AA 的液质，无须进一步的优化碰撞能量，也可以满足物质依赖和精神卫生服务管理局 (SAMHSA) 的规定要求。

结论

本研究介绍了利用液相色谱 / 质谱 / 质谱进行唾液中滥用药物的快速检测方法。分析灵敏度完全满足物质依赖和精神卫生服务管理局 (SAMHSA) 的规定要求，而且多反应监测既可以定量分析，又可以进行分析物的确认分析。采用安捷伦的 2.1 毫米的内径，1.8 微米的 C18 色谱柱，在较高的流速条件下，可以获得出色分离和色谱峰形。

参考文献

1. "Rules Proposed for Workplace Drug Testing", *SAMHSA News*, **12** (3) May/June 2004; a publication of the United States Department of Health and Human Services.
2. J. M. Hughes, D. M. Andrenyak, D. J. Crouch, and M. Slawson, "Comparison of LC-MS Ionization Techniques for Cannabinoid Analysis in Blood", Society of Forensic Toxicologists, 2002 Annual Meeting, Dearborn, MI.

如需更多信息

如需了解安捷伦产品及服务的更多信息，请访问我们的网站 "www.agilent.com/chem"。

如需了解本应用的详细内容，请与安捷伦公司的 Michael Zumwalt 联系。

致谢

特别感谢安捷伦公司的同事 John M. Hughes 提供的宝贵意见和对文件的审阅。

安捷伦对本材料中的错误或与服务、性能或本品的使用有关的意外损坏或由此造成的损失概不负责。

本出版物的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2006

中国印刷
2006 年 6 月 20 日
5989-4856CHCN

