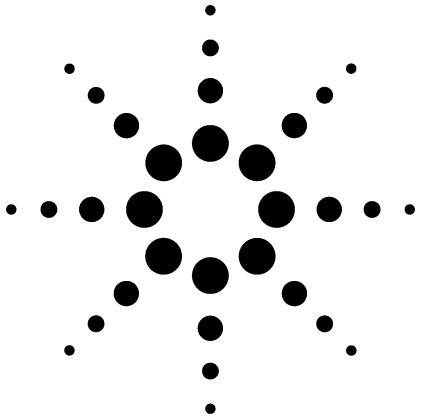
# 唾液中 THC 的高分辨二维 GC/MS 法确认研究

## 应用



**法医**


## 作者

Dean F. Fritch, Ph.D., DABFT, DABCC-TC
Orasure Technologies, Inc.
150 Webster Street
Bethlehem, PA 18015
USA

Bruce D. Quimby, Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA



## 摘要

**在雇用、药物治疗、假释和被怀疑吸毒行为检测等方面，唾液代替尿液用于药物检测的应用日益广泛。与尿液样品相比，唾液取样对人体几无侵害并且唾液样品组成简单。唾液样品通常采用 ELISA 法进行分析，但针对那些经初步检测呈阳性的样品需要进一步采用质谱法进行确认。**

**用于唾液样品中滥用药品(DOA)确认的分析技术必须能够检测到比尿样更低的浓度。比如，针对采用 Intercept® 唾液收集器采集的含四氢大麻酚(THC)很低浓度的稀释样品，其检测限必须能够达到 0.5 ng/mL。多种样品基质的干扰会使分析复杂化。针对这些复杂生物样品，气相色谱／质谱／质谱(GC/MS/MS)和液相色谱／质谱／质谱(LC/MS/MS)等分析技术已被采用。二级质谱的高选择性已可以解决样品干扰问题。**

**GC/MS 分析的高灵敏度可以满足 THC 的检测，但缺乏去除基质干扰的能力。本研究描述了一种二维（中心切割）GC/MS 系统，THC 从无极性的 DB-1ms 柱被中心切割到极性的 DB-17ms 柱。采用一个空气致冷的聚焦阱来提高分析的分辨率和灵敏度。高分辨二维(2-D) GC 与标准轻便的四极杆气相色谱／质谱(MSD)联用，可以满足 THC 确认分析对选择性和灵敏度的要求。**


## Introduction

带四级杆质谱仪的 GC/MS 是目前应用广泛的一种分析技术，它具有优异的选择性、灵敏度，低消耗，以及可以进行库检索鉴定的优点，使这种仪器成为多年来可靠的应用选择。然而，一些样品的基质干扰经常使我们不能对目标物进行成功分析。GC/MS/MS 和 LC/MS/MS 已被应用于这类化合物的分析。二级质谱的较高选择性可以解决样品干扰问题。在很多情况下，尤其在待分析目标化合物数目有限的情况下，二维（中心切割）GC 和标准四级杆 MS 系统联用是一种简便和经济的选择。

本应用介绍了一种二维（中心切割）GC/MS 系统。该仪器包括一套标准的四级杆 GC/MS 系统，并且配置了 Deans Switch 及气冷的聚焦阱装置。第一根 GC 柱一般是非极性的 DB-1ms 柱，第二根为极性的 DB-17ms 柱。进样后，分析物首先在第一根柱中分离，受时间程序控制的 DeanSwitch 装置根据被分析

物的流出时间按不同时间段将被分析物从第一根柱中心切割到第二根柱中，在那里它们同时被气冷阱聚焦。通过热解吸作用，被测物在第二根柱中进一步与从第一根柱中共流出的基质成分分离，聚焦阱的作用是提高分辨率和灵敏度。二维(2-D) GC/MS 分离在这里替代了二级质谱操作。被测物完全流出后，柱中的载气可反吹，把不需要的高沸点样品组分从进样口的分流口冲 = 吹出。这种操作不仅节省了分析时间，而且减少了柱清洗和更换柱的次数。由于只有一小部分进样的样品进入 MS 离子源，离子源的清洁工作也得以减少。针对有限数量的被测物（一般五个或更少），高分辨 2-D GC/MS 是替代 MS/MS 技术的合适选择。

高分辨 2-D GC/MS 可以很好地用于唾液中滥用药的检测。

唾液样品作为尿样的替代品近来已越来越多地用于检测药物接触和机体损伤。采用唾液样品有许多优点，包括易于采集取样，样品极少被污染，采集费用低，采集程序易于安排，不容易错过采样时间等。

唾液样品检测的一个难题就是阳性筛选结果的确证，比如，唾液中 THC 的浓度要求可确认低至 0.5 ng/mL。由于样品基质中非药物成分的色谱重叠和相同 $m/z$ 值离子的干扰，这个浓度 THC 的定量分析非常困难。针对这个问题，LC/MS/MS 和 GC/MS/MS 时常被用于确认分析。本文研究表明高分辨 2-D GC/MS 可用于唾液中 THC 的分析，二维色谱极高的分辨率可以解决 THC 与基质干扰分离的问题。本方法的检测结果与 MS/MS 分析结果相当。

## 实验部分

### GC/MSD 配置

GC/MSD 结构示意图见图 1。系统包括：

| | |
|---|---|
| G1540N | 6890N 网络化 GC 系统，可选件包括： |
| | 652 唾液分析工具包 （包括 Cryo-Trap, PCM 和 15M DB-1MS, 15M DB-17MS 柱 ）； |
| | 112 带 EPC 的分流/不分流进样口 (112)； |
| | 201 MSD 接口(201)； |
| | 211 带 EPCEPC 的毛细管 FID (211)； |
| | 888 微流控 dean switch 装置； |
| | 002 (240 V 快速柱箱升温电源)或 003 (198 to 231 快速柱箱升温电源)； |
| G3243A | 5975B inert MSD/DS perf turbo EI bundle ； |
| G3397A | 真空规/控制器，用于 5975 MSD ； |
| G2913A | 7683B 自动进样器模块； |
| G2614A | 7683 自动进样器样品瓶盘模块； |

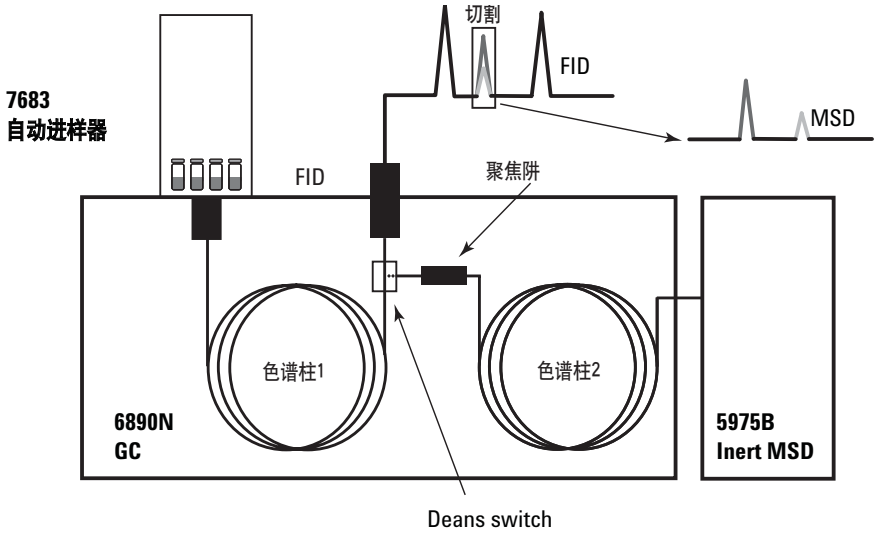



**图 1　2-D 中心切割 GC/MSD 系统的硬件配置**

气相色谱和质谱的操作条件见表 1

**表 1. 气相色谱和质谱条件**

**GC**

Agilent 6890N
7683 自动进样器及样品瓶盘

**自动进样器**

| | |
|---|---|
| 样品洗涤次数 | 0 |
| 样品进样次数 | 0 |
| 进样体积(µL) | 4 |
| 进样器体积(µL) | 10 |
| 进样前溶剂 A 清洗次数 | 0 |
| 进样前溶剂 B 清洗次数 | 0 |
| 进样后溶剂 A 清洗次数 | 10 |
| 进样后溶剂 B 清洗次数 | 10 |
| 黏度延迟(s) | 2 |
| 活塞速度 | 慢 |
| 进样前停留(min) | 0 |
| 进样后停留 l(min) | 0 |

**前进样口**

| | |
|---|---|
| 类型 | EPC 分流/不分流 |
| 型号 | 连续压力 |
| 进样口温度 | (°C) 250 |
| 进样方式 | 脉冲不分流 |
| 脉冲压力(psig) | 45 |
| 脉冲时间(min) | 0.5 |
| 冲洗时间(min) | 1 |
| 冲洗速量(mL/min) | 50 |
| 表观压力(psig) | 26.59 |
| 载气节省 | 关 |
| 气体类型 | 氦气 |

**后进样口**

| | |
|---|---|
| 类型 | PCM/聚焦阱 |
| 初始温度(°C) | 300 |
| 初始温度保持时间(min) | 5.3 |
| 升温速率 1 (°C/min) | 799 |
| 终温 1 (°C) | 100 |
| 终温 1 保持时间(min) | 2 |
| 升温速度 2 (°C/min) | 799 |
| 终温 2 (°C) | 300 |
| 终温 2 保持时间(min) | 10 |

**柱箱**

| | |
|---|---|
| 电压(VAC) | 240 |
| 初始炉温(°C) | 130 |
| 初始炉温保持时间(min) | 0.5 |
| 升温速度 1 (°C/min) | 35 |
| 终温 1 (°C) | 250 |
| 终温 1 保持时间(min) | 0 |
| 升温速度 2 (°C/min) | 10 |
| 终温 2 (°C) | 280 |
| 终温 2 保持时间(min) | 2.5 |
| 平衡时间(min) | 0.5 |

**色谱柱 1**

| | |
|---|---|
| 进样口 | 分流/不分流（前） |
| 类型 | DB-1 ms |
| 安捷伦部件号 | 122-0112 |
| 长度(m) | 15 |
| 直径(mm) | 0.25 |
| 膜厚(µm) | 0.25 |

**色谱柱 2**

| | |
|---|---|
| 入口 | Deans switch（后） |
| 类型 | DB-17 ms |
| 安捷伦部件号 | 122-4712 |
| 长度(m) | 15 |
| 直径(mm) | 0.25 |
| 膜厚(µm) | 0.25 |

**FID**

| | |
|---|---|
| 温度 (°C) | 250 |
| 氢气流量(mL/min) | 50 |
| 空气流量(mL/min) | 450 |
| 模式： 尾吹气恒流 | 尾吹气恒流 |
| 氮气尾吹气流量(mL/min) | 45 |
| 数据采集频率(Hz) | 10 |

**Deans Switch**

| | |
|---|---|
| FID 限流阀长度(m) | 0.31 |
| FID 限流阀内径(mm) | 0.10 |
| 载气源 | 低温冷阱 PCM |
| Deans 压力(psig) | 19.60 |
| THC 切割起始时间(min) | 6.33 |
| THC 切割结束时间(min) | 6.44 |

**MSD**

| | |
|---|---|
| Agilent technologies | 5975B inert MSD |
| 溶剂延迟(min) | 4 |
| 调谐文件 | Atune.U |
| 模式 | SIM |
| EM 电压 | Atune voltage |
| 四极杆温度(°C) | 150 |
| 离子源温度(°C) | 230 |
| 传输线温度(°C) | 280 |
| 采集模式 | SIM |
| 驻留时间(msec) | 10 |
| THC-TMS SIM ions | 离子 371, 386, 303 |
| THC-D3-TMS SIM ions | 离子 374, 389, 303 |

**后运行反吹条件**

| | |
|---|---|
| 反吹时间(min) | 3 |
| 炉温(°C) | 300 |
| 色谱柱 1 压力(psig) | 1.0 |
| 色谱柱 2 压力(psig) | 65 |

### 唾液样品的采集和制备

唾液样品采用 Intercept® 唾液收集器(OraSure Technologies)从滥用毒品门诊的 20 位病人中采集。采集到的唾液样品约每 400 µL 用 800 µL 防腐缓冲液稀释。

对样品中 THC 的检测采用 OraSureTechnologies 公司(OTI 的 Intercept Micro-Plate EIA Screen 系统。THC 检测呈阳性的样品将采用下面介绍的方法进行 TMS 衍生化，然后进行 2-D GC/MSD 分析。

除了采用唾液稀释剂(OTI)模拟样品基质外，校准标准品的制备过程同唾液样品。

用于进行 2-D GC/MSD 分析的样品制备过程包括：

- 采用 4mL 50 mM 磷酸溶液稀释 400 µL 唾液样品；
- 加入 THC 重氢内标溶液 (2 ng/mL)；
- 用 500 µL 甲醇冲洗色谱柱；
- 稀释的样品溶液进样(Varian SPEC DAU 30 mg)；
- 用 2 mL 50/50 (甲醇/水)冲洗；
- 干燥 2 min ；
- 用 1mL 78/20/2 （二氯甲烷/异丙醇/氨水 ） 洗脱；
- 70 °C 下，干燥并且采用 25 µL BSTFA+1%TMCS 溶液衍生化 15 min ；
- 加入 25 µL 乙腈

（THC 和重氢 THC 标准品购自 Cerilliant 公司； BSTFA+1%TMCS 购自 Pierce 公司）

### Deans Switch 的操作

Deans Switch 部件是一种用于将第一根柱中的组分峰中心切割到第二根柱中的流体装置。针对采用质谱进行痕量毒品的分析，在样品组分经过路径上有严格的要求。这些要求是：不能有任何的漏气现象；样品与流路表面没有相互作用；死体积小；易于操作；长时间使用可靠性强。Agilent Deans Switch 装置能够完全满足这些要求。有关这种装置更详细的说明及其应用请参看文献 1。

图 2a 为电磁阀关闭时 Deans Switch 装置的示意图。阀在图 2a 所示的位置时，流出物通过限流器从 DB-1ms 柱被推向 FID 检测器。而如图 2b，当电磁阀打开时，流出物将被推向 DB-17ms 柱。通过时间程序调控螺管阀在组分峰流出前打开和流出后关闭，从而实现了组分峰从柱 1 到柱 2 的中心切割。

Deans Switch 装置的第二个用途是反吹色谱柱 1。在每次运行结束时，把柱箱温度提高到 300 °C，分流 / 不分流进样口压力降到 1 psig，PCM 压力升到 65 psig。这种进样口的压力变化会使载气反向流过色谱柱 1。这种反向气流会从分流放空口反吹掉存在于色谱柱 1 柱头的任何高沸点物质。反吹提高了柱寿命并且使色谱基线平直。反吹模式示意图见图 2c。

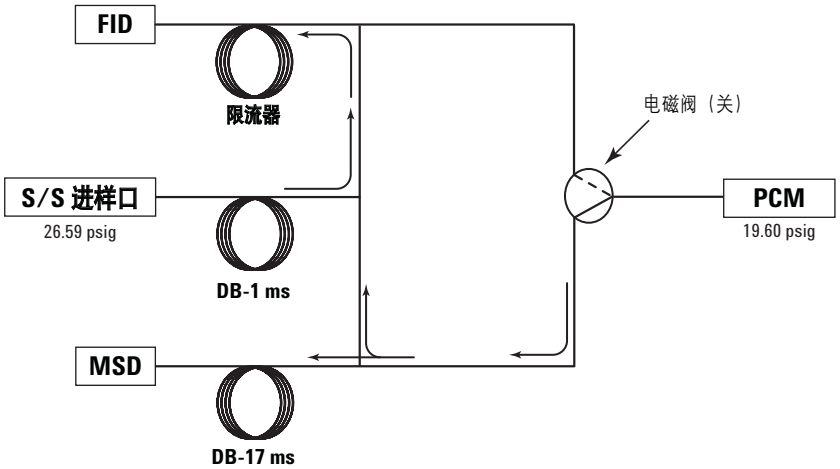



**图 2a. 未切换时 Deans Switch 阀示意图。色谱柱 1 组分流向 FID**

**温度梯度和切换时间**

在决定二维色谱方法的分析参数时，需首先确定柱箱的温度程序。起始炉温一般选择不会引起分析物峰展宽和扭曲的最高值。10 ng/mL 的 THC 标准样品在 100 °C – 150 °C 的起始温度范围内进行分析，同时监测它在 FID 上的峰形（未进行中心切割）。考察结果表明，130 °C 的效果最好。在不会引起炉温控制警告的情况下，选择炉温以 35 °C/min 的速度从 130 °C 升到 250 °C。为了在色谱柱 1 中提高 THC 与其它基质成分的分离度，在 THC 流出约 2 min 前，将升温速率降低到 10 °C/min。THC 流出后保持在 280 °C 恒温。

图 3a 显示了某病人样品在色谱柱 1 中的色谱图，表明存在大量基质化合物。图 3b 是 THC 流出区域的放大图。图 3b 还展示了一张 10ng/mL THC 标准溶液的色谱图。THC 的切换时间范围选择在 THC 峰刚好要出现和刚好结束之后。本文选择的切换时间是 6.33 – 6.44min。

切换时间选择好后就是聚焦阱的温度程序优化。聚焦阱的温度最初保持在 300 °C（即没有捕获），在切换时间之前约 1-2 min 程序降温到 100 °C，这是为了保证中心切割时聚焦阱温度为 100 °C。切换结束后，聚焦阱温度以最大的升温速率(799 °C / min)程序升温至 300 °C，这会解吸掉捕获的多种成分。通常解

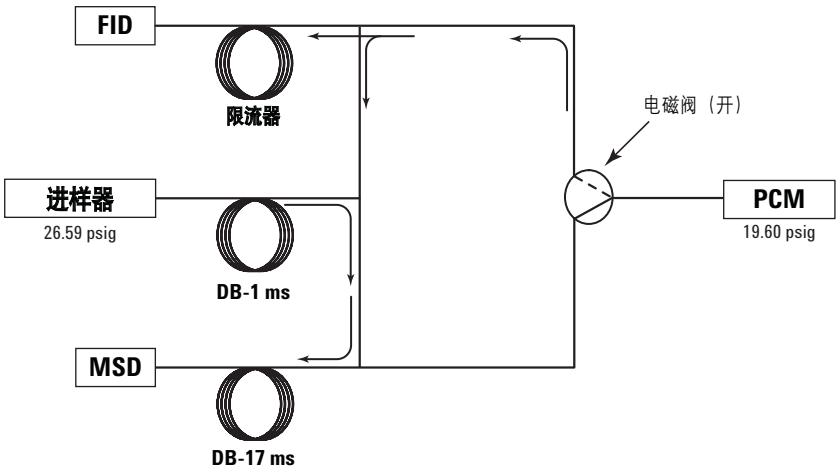



**图 2b. 切换时 Deans Switch 阀示意图。色谱柱 1 组分流向柱 2**

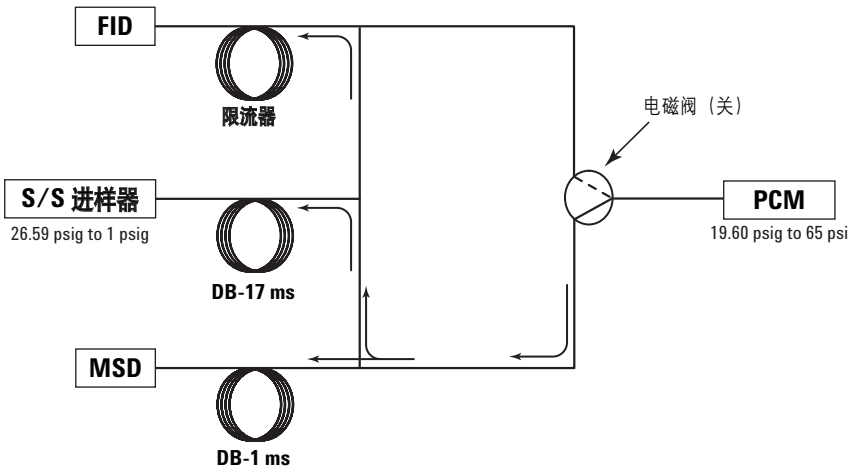



**图 2c. 反吹色谱柱 1。在最后一个被测组分从色谱柱 2 流出后，将进样口压力降到 1 psig，同时将 PCM 的压力升到 60 psig，将高沸点的组分反吹出分流放空口**

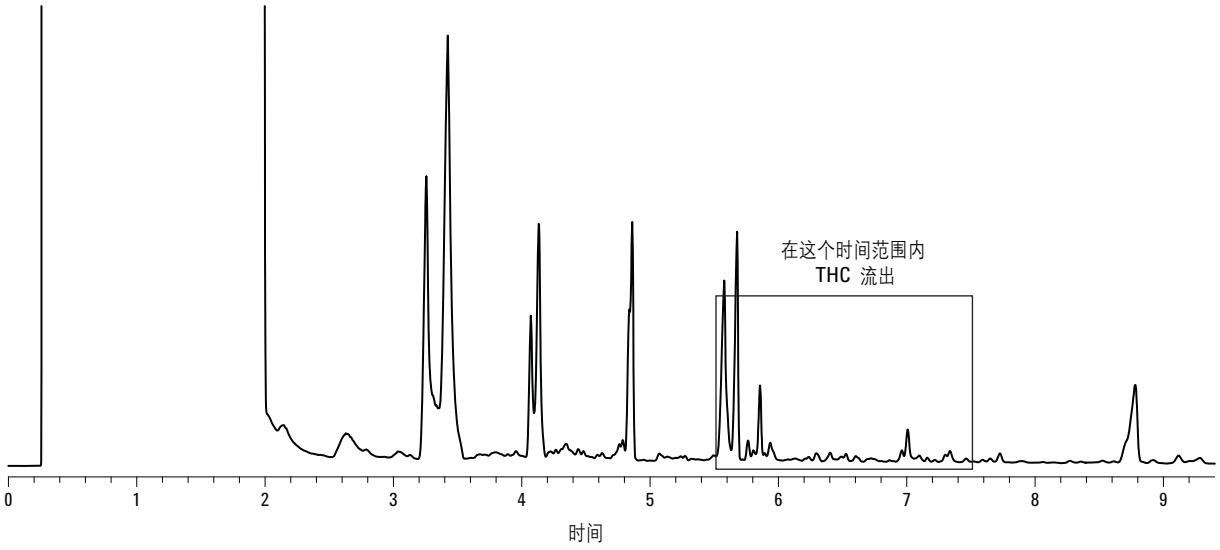



**图 3a.　病人样品在色谱柱 1 的 FID 色谱图，表明了基质干扰的复杂性（未切换到色谱柱 2）**

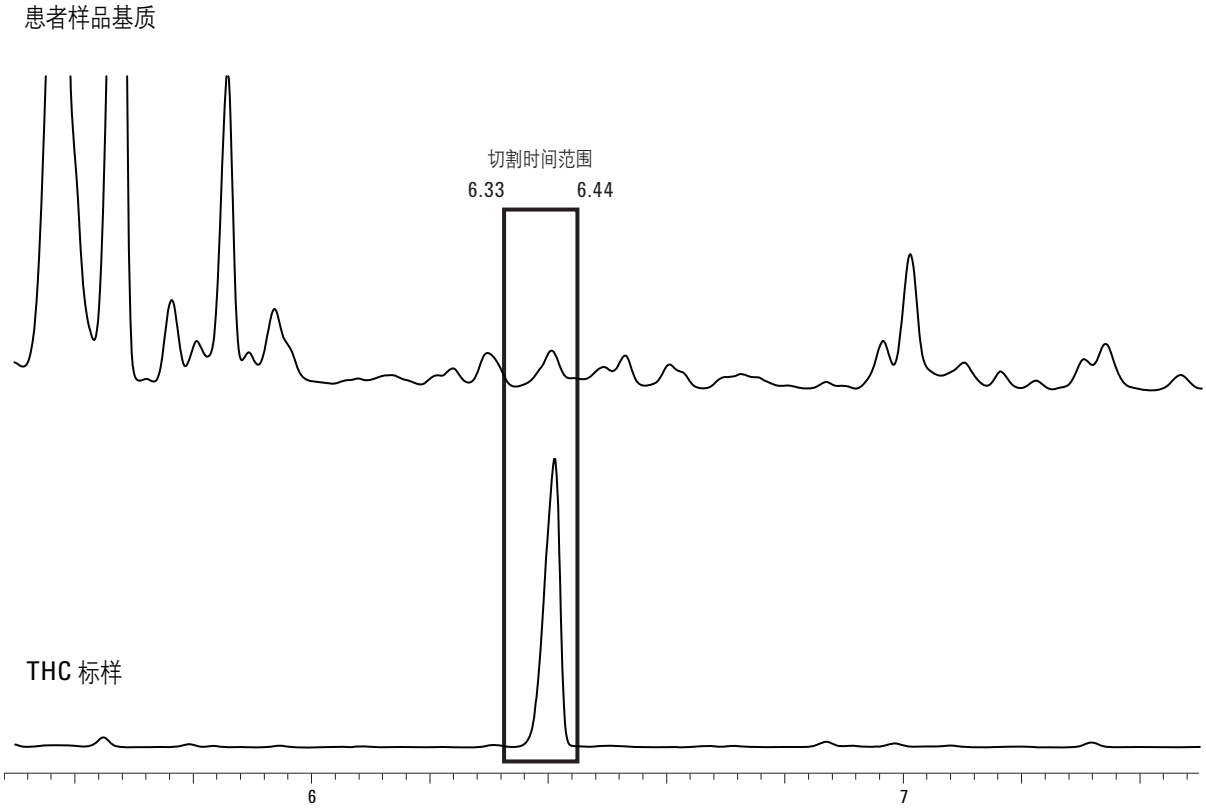



**图 3b.　图 3a 中 THC 流出区域的放大图**

吸在切换结束约0.2 min后开始。本文解吸在切换结束约1 min后开始。

图4是表示阱温、炉温和Deans Switch阀之间关系的时间表。

## 结果与讨论

图5a是进样2 ng/mL的内标(THC-D3)后样品的SIM色谱图。内标的保留时间与THC非常接近，只比THC提前0.002 min。由于它们的保留时间如此接近，THC切换时间的选择也要很好满足内标的要求。

图5b是一张截取浓度为0.5 ng/mL未提取THC标准品的SIM图谱。唾液样品中THC的浓度低于截取浓度的为阴性样品。图5b中，样品中的THC未经样品净化处理而直接进行了衍生化，用于样品制备过程中回收率测定的参照。

在替代品唾液中制备截取水平的标准样品，经过全部制备过程的样品色谱图见图5c。与未经提取的图5b的响应相比，回收率达到70 %或更高，同时表明在THC保留时间范围内，样品制备中的残留物对该截取浓度下的定量分析无干扰。

一个THC检测呈阳性的病人样品色谱图见图5d。检测得到的浓度为0.64 ng/mL，正好高于截取浓度水平。THC保留时间区域内无明显干扰。

图5e是一张病人阴性样品的色谱图。THC的浓度低于校正浓度的最低水平，估计浓度只有0.17 ng/mL。

图6为通过MSD ChemStation 绘制的THC校正曲线。THC的线性范围是0.2-32 ng/mL，包括了我们的截取浓度水平。

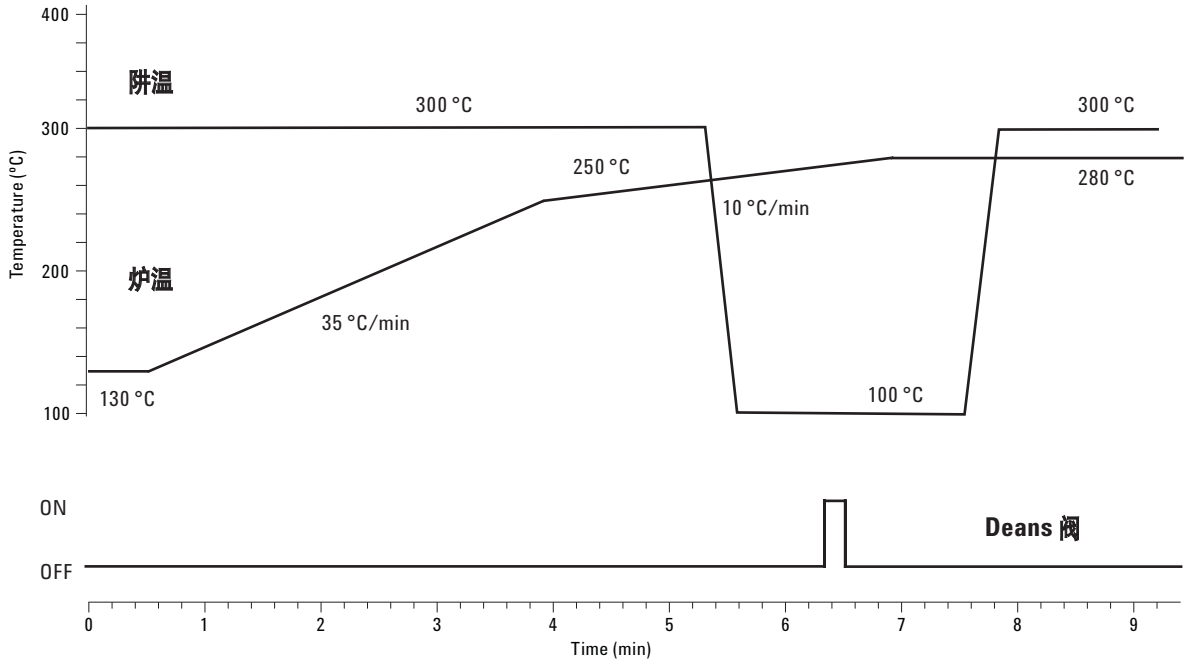



**图4. THC分析的温度和阀切换时间程序**

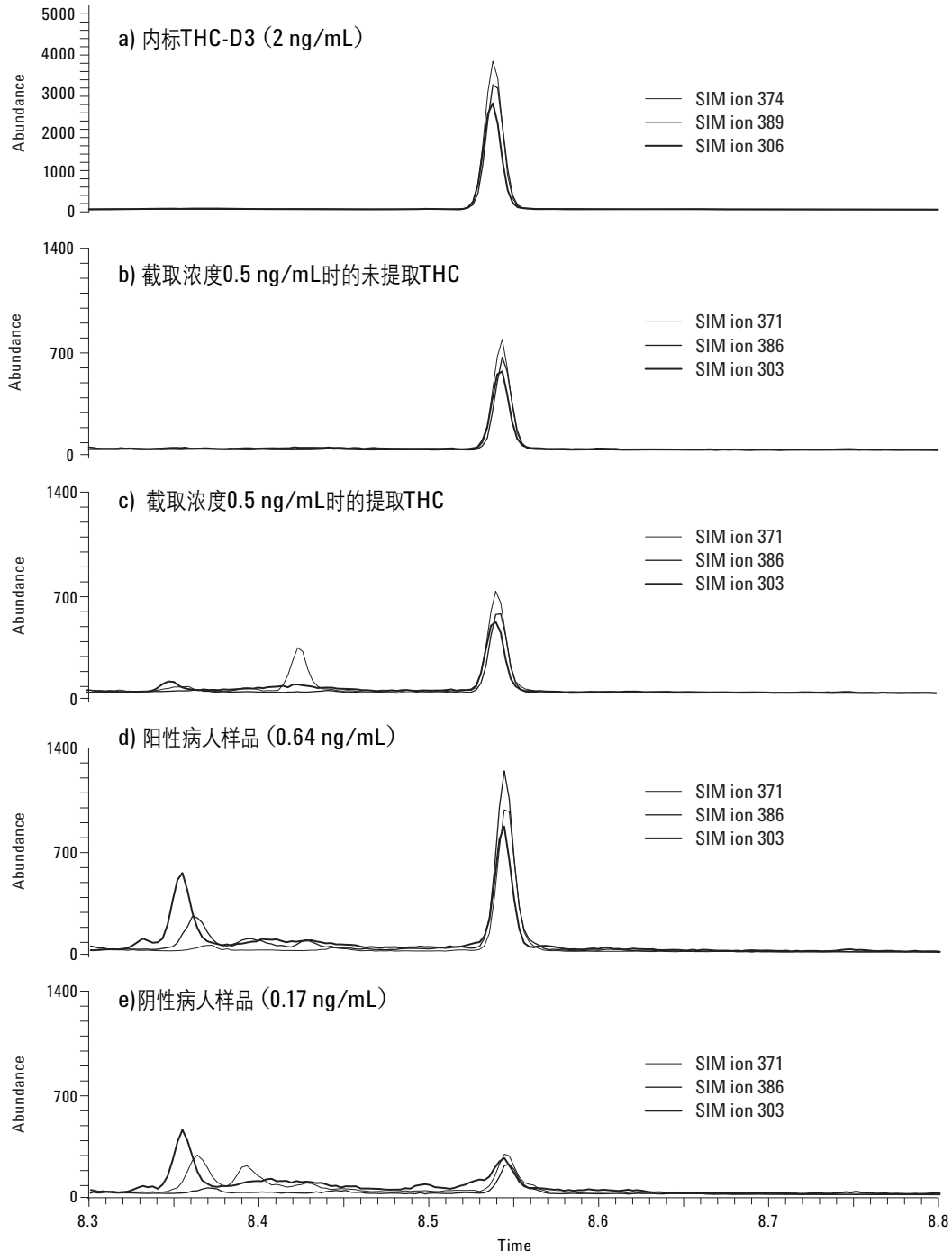



**图5. 组分离子的选择离子检测色谱图**

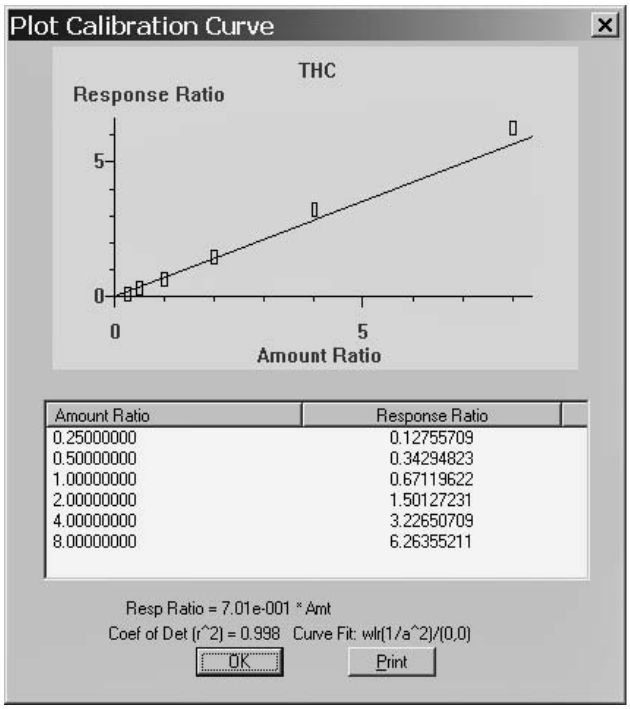



**图6. THC校正曲线**

本方法的分析结果总结见表2。每个浓度水平的数据结果均基于三次测定值。LOD为检出限，LOQ为定量限。标明“Mean”的一列为某标准品三次测定并通过校正曲线计算的浓度平均值。“STDEV”列为平均值的标准偏差，%CV为百分变异系数。“%Accuracy”列表示测量值与真实值的符合程度，如为100 %，符合程度最好。表3是同一样品分别采用EIA法和2-D GC/MS法测定结果的比较。

**表2. THC校正结果**

| | ng/mL | Mean* | STDEV | %CV | %Accuracy |
|---|---|---|---|---|---|
| LOD (0.2X) | 0.1 | 0.22 | 0.03 | 12.86 | 220.00 |
| LOQ (0.4X) | 0.2 | 0.29 | 0.01 | 3.94 | 146.67 |
| Cutoff (X) | 0.5 | 0.46 | 0.08 | 16.58 | 91.33 |
| 2X | 1 | 1.03 | 0.04 | 4.23 | 103.00 |
| 4X | 2 | 1.95 | 0.04 | 2.07 | 97.67 |
| 8X | 4 | 4.08 | 0.17 | 4.17 | 102.08 |
| Pos control | 2 | 1.86 | 0.06 | 2.99 | 93.00 |
| 回收率 | | | 70 % | | |
| 线形 | | | 0.2–32 ng/mL | | |
| 交叉污染 | | | 小于32 | | |

*3次测定

本方法的分析结果总结见表2。每个浓度水平的数据结果均基于三次测定值。LOD为检出限，LOQ为定量限。标明“Mean”的一列为某标准品三次测定并通过校正曲线计算的浓度平均值。“STDEV”列为平均值的标准偏差，%CV为百分变异系数。“%Accuracy”列表示测量值与真实值的符合程度，如为100 %，符合程度最好。表3是同一样品分别采用EIA法和2-D GC/MS法测定结果的比较。

表3左侧部分是20位病人样品的检测结果。左上区域的数据显示，有四份样品采用两种方法检测均呈阳性。一份样品采用GC/MS分析为阴性，而采用EIA分析为阳性。由于GC/MS被当作对照方法，从而EIA分析结果被定性为假阳性。左下区域数据显示，采用GC/MS法分析没有阳性样品，同时采用EIA法分析均呈阴性，那就是说，采用EIA检测没有假阴性结果。其余的15个样品用两种方法分析均呈阴性。

**表3. EIA和2-D GC/MS分析结果比较**

| | | GC/MS + | GC/MS – | | Deans switch | Package insert |
|---|---|---|---|---|---|---|
| EIA | + | 4 | 1 | N | 20 | 200 |
| | – | 0 | 15 | Sensitivity | 100% | 97.62% |
| | | | | Specificity | 93.75 | 91.67 |
| | | | | Confirm cutoff | 0.5 | 0.5 |

表3右侧部分描述了GC/MS与EIA两种方法在灵敏度和特异性方面的比较。其中，灵敏度被定义为真阳性样品的数目除以真阳性和假阴性样品数目之和。两种分析方法检测均为阳性的为真阳性样品。特异性被定义为真阴性样品的数目除以真阴性和假阳性样品数目之和。

表3最右面一列的数据来自Intercept EIA试剂盒附带的200份病人样品结果，表明采用2-D GC/MS技术的分析结果与200份样品的研究结果符合性很好。

## 结论

高分辨2-D GC/MS可以作为唾液中THC确证的分析技术。采用Intercept®收集器采集的样品背景对分析没有明显干扰。采用0.4 mL样品的分析结果与2 ng/mLTHC的“withdrawn” SAMHSA Guideline分析结果一致。

注释：本文采用0.5 ng/mL THC的样品溶液，是为了补偿采用Intercept®收集器采集时，防腐缓冲液对唾液样品的稀释作用。

采用Intercept EIA和2-D GC/MS方法分析来自门诊的20位病人样品的结果显示，其灵敏度和特异性与试剂盒测定的结果一致。

## 参考文献

1. James D. McCurry, “Using a New Gas Phase Micro-Fluidic Deans Switch for the 2-D GC Analysis of Trace Methanol in Crude Oil by ASTM Method D7059,” Agilent Technologies publication 5989-1840EN

## 如需详细信息

如需安捷伦的产品和服务的更多信息，请访问本公司网站：www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本材料中的错误与设备、性能或本品的使用有关的意外伤害或由此造成的损坏不负任何责任。

本文中的信息，说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司。2006

2007年7月中国印刷

5989-5668CHCN

Agilent Technologies