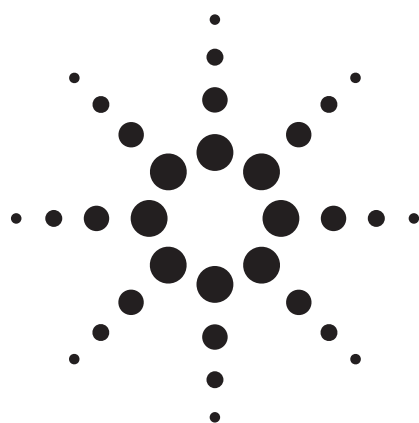




固相萃取和液相色谱 — 串联质谱测定人发中的可卡因、苯甲酰芽子碱、可卡乙碱和去甲可卡因应用

法医

作者

Christine Moore, Cynthia Coulter, and Katherine Crompton
Immunalysis Corporation
829 Towne Center Drive
Pomona, CA 91767
USA

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
9780 S. Meridian Blvd.
Englewood, CO 80112
USA

摘要

本次研究建立和验证了毛发中可卡因、苯甲酰芽子碱、可卡乙碱和去甲可卡因的定量分析检测方法。毛发样品经清洗、保温，其含有的药物成分固相萃取和液相色谱-串联质谱检测以大气压化学电离正离子模式进行了定量分析。监测了两种裂解转变并计算其离子比用于结构确证，要求该比值与已知校正标准品相比，偏差在 20% 以内。监测定性离子的裂解转变并要求它与主要子离子有特定的比值，这限制了定量分析的灵敏度，对苯甲酰芽子碱来说尤其如此；然而，提高最终结果的可靠性与法医鉴定的可防卫性更为重要。即使是在同时监测的状态下，也能达到美国联邦关于毛发分析的指导方针中提议的浓度水平。

定量限为 50 pg/mg；检测限为 25 pg/mg。定量分析可卡因、苯甲酰芽子碱、可卡乙碱和去甲可卡因的日内精密度（100 pg/mg, n = 5）分别为 1.3%，8.1%，0.8% 和 0.4%；日间精密度（n = 10）分别为 4.8%，9.2%，15.7% 和 12.6%。应用该方法同时测定了能力验证样品和在美国进行研究工作时获得的样品。

引言

在关于毛发分析的美国联邦法规提案中包括可卡因（COC）及其代谢物的分析。提议的代谢物限定浓度为 50 pg/mg，通常使用电子轰击气相色谱-质谱（GC/MS）方法难以达到这一浓度水平[1, 2]。可能存在的原因有：无法对可卡乙碱（CE）进行衍生化以提高其响应值，去甲可卡因（NC）和 CE 的共洗脱，或 NC 和苯甲酰芽子碱（BZE）的衍生物可能产生相同的子离子。已开发出可以达到上述检测要求的方法，包括正离子化学电离 GC/MS[3]，以及 GC-串联质谱法[4]。

有两篇论文记载了使用 LC/MS/MS 以大气压化学电离（APCI）模式分析可卡因及其代谢物的方法，与我们的方法类似[5,6]。第一篇仅分析了可卡因和 BZE，但是更为重要的是，两种方法在多反应监测分



Agilent Technologies

析模式 (MRM) 下均仅对一种裂解转变进行了监测。最近, 一些作者注意到需要对第二种裂解转变进行监测, 计算主要离子和次要离子的丰度比值, 以提高最终结果的可信度。Maralikova 和 Weinmann[7]指出使用 LC/MS/MS 进行确证分析的指导方针尚未建立, 同时建议为了对药物进行足够的鉴定, 需要监测至少两种裂解转变。Johansen 和 Bhatia[8]阐述了使用 LC/MS/MS 分析全血和尿中的可卡因及其代谢物的方法, 重点在于建立了基于两种 MRM 的鉴定标准, 包

括这两种转变的比值和保留时间。这对于分析具有相似的分子量和化学性质的化合物尤其重要, 因为经常会有相同的碎片离子产生。

为了提高所得结果的可信度, 我们将这些建议用于串联质谱, 开发并验证了使用 LC/MS/MS 分析毛发中可卡因及其代谢物的方法。该方法被用于我们实验室从能力验证项目获得的样品和研究性样品中。这些化合物的结构式见图 1。

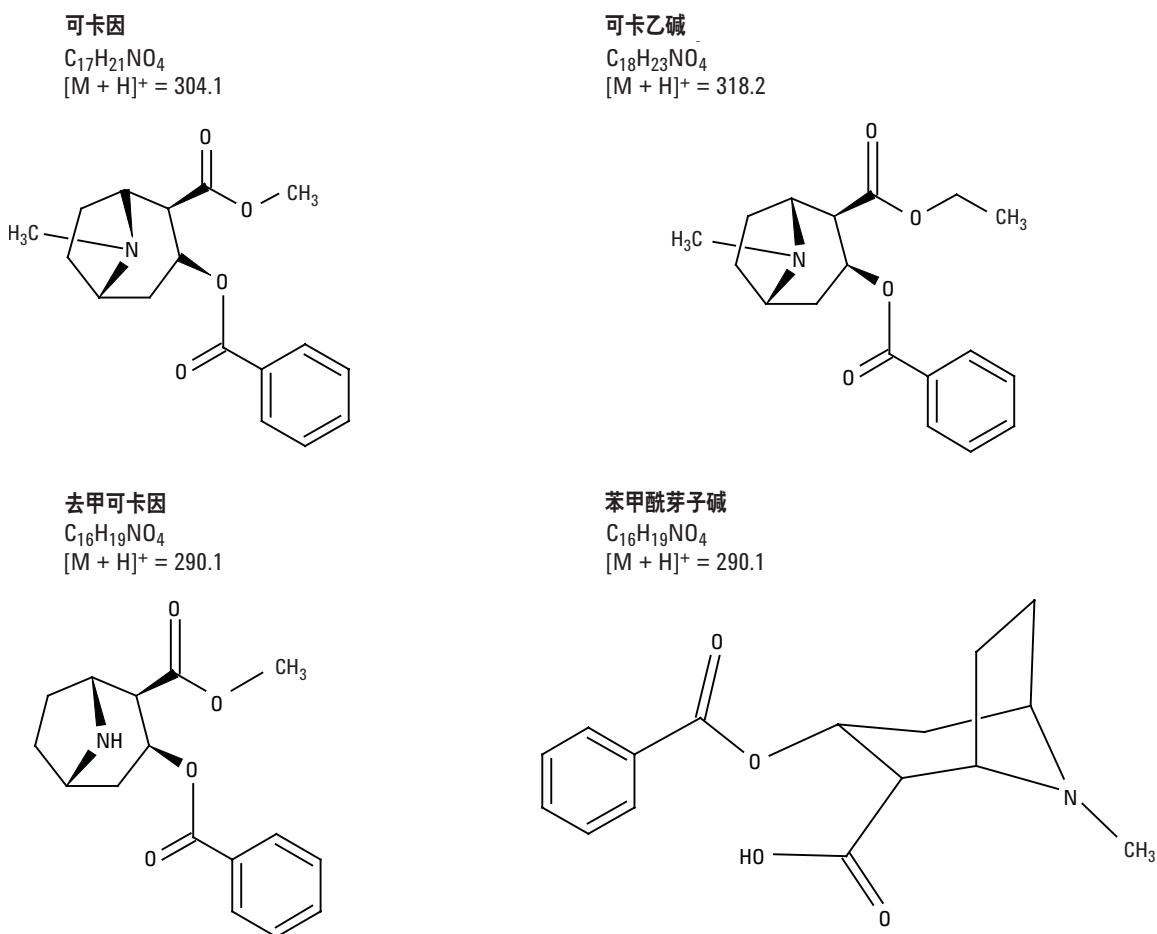


图 1. 本文中研究的可卡因及其代谢物的结构式

实验部分

样品制备

标准品及试剂

氘代内标物质（BZE-d3，可卡因-d3，NC-d3 和 CE-d8）及每个药物的无标签药用标准物质均来自 Cerilliant（Round Rock, TX）。固相萃取柱（Clin II, 691-0353T）来自 SPEWare（San Pedro, CA）。所有试剂均为 HPLC 级或更纯，所有化学物质均为 ACS 级。

校正标准溶液

对于色谱校正标准品，取氘代内标物质，用甲醇制成浓度为 200 ng/mL 的工作溶液。无标签的药用标准品用甲醇制成相同浓度的溶液。所有工作溶液不用时均在 -20 °C 贮存。对于每批样品，用不含滥用药的毛发（10 mg）制成八个校正标准品。制成的毛发中药物浓度为 25, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000 和 10,000 pg/mg（内标物质浓度：1,000 pg/mg）。

液相色谱分析的样品制备

取一份毛发（10mg），用二氯甲烷（1.5 mL）简单淋洗，以除去毛发中的处理物，如摩丝、喷雾、发胶等，晾干。将毛发剪成小段，加内标物质 50 μ L。加 0.025 M 磷酸盐缓冲液（pH 2.7）1.5 mL，75 °C 超声 2 小时。将该缓冲液倒入干净玻璃试管中，分别加 0.1 M 磷酸盐缓冲液（pH 6.0）1 mL 至校正标准溶液、质量对照样品和毛发样品中。混匀，离心 10 分钟以确保没有成根的毛发进入固相萃取柱中。将固相混合型萃取柱（Clin II, 691-0353T）置于正压的多路连接管中。每个萃取柱用二氯甲烷:甲醇:氨水（78:20:2 v,v）2 mL、乙酸乙酯 2 mL、甲醇 2 mL 和 0.1 M 盐酸 1 mL 进行处理。将样品流过萃取柱，然后用去离子水 2 mL、0.1 M 盐酸 2 mL、甲醇 2 mL 和乙酸乙酯 2 mL 洗柱。洗柱过程中，萃取柱用氮气吹干（30 psi；2 分钟）。药物最终被新制的二氯甲烷:甲醇:氨水（78:20:2 v,v）3 mL 洗脱。将洗脱液在 40 °C 用氮气蒸干后，加甲醇 50 μ L 制成溶液。

数据分析

使用氘代内标物质的校正曲线对所有药物在 25 ~ 10,000 pg/mg 的浓度范围内用线性回归分析进行计算。目标分析物和对应的氘代标准的峰面积比值用安捷伦的 Mass Hunter 软件进行计算。这些数据用线性最小二乘回归曲线进行拟合，权重为 1/x，且不强制过原点。

选择性

无毒的毛发样品来自志愿者，按上述方法进行提取和分析以考察提取物或基质或可能存在的离子抑制产生的干扰。使用大气压化学电离，发生离子抑制的可能性不如电喷雾模式普遍。另外，经常遇到的药物干扰也被加入无毒的毛发样品中并进行相同的提取和分析。下列药物以 20,000 pg/mg 的浓度按上述方法进行分析：吗啡、6-乙酰吗啡、可待因、二氢可待因酮、氢吗啡酮、氧可酮、羟吗啡酮、曲马多、去甲基曲马多、芬太尼、 γ -羟基丁酸（GHB）、四氢大麻酚（THC）、9-羧基-THC、苯丙胺、甲基苯丙胺、亚甲基二氧基甲基苯丙胺（MDMA）、甲基二氧基苯丙胺（MDA）、亚甲基二氧基乙基苯丙胺（MDEA）、异丙基甲丁双脒、美沙酮、苯环利定、地西泮、去甲地西泮、奥沙西泮、阿普唑仑、氯氮卓、溴西泮、替马西泮、劳拉西泮、氟西泮、7-氨基氟硝西泮、 α -羟基阿普唑仑、硝西泮、三唑仑、 α -羟基三唑仑、阿米替林、去甲替林、丙咪嗪、普罗替林、多虑平、去甲多虑平、三甲丙咪嗪、西可巴比妥、戊巴比妥、布他比妥和苯巴比妥。

线性和灵敏度

定量分析的线性由八个校正点确定，不包括不含滥用药的基质。方法的灵敏度由定量限（LOQ）表示，定义为信噪比（S:N）不小于 10 且保留时间与校正标准品的差值在 0.2 之内的最低检出浓度。检测限（LOD）为信噪比（S:N）不小于 3 的最低检出浓度。

精密度

计算了所有药物在 100 pg/mg 校正点含量的日间（天与天之间）和日内（同一天）精密度。日内数据来自同一天内进行的五次分析；日间数据来自 5 天进行的总共 10 次样品分析（5 天，每天 2 个样品，n = 10）。

稳定性

通过将自动进样器的样品瓶在液相色谱室内存放 48 小时，然后重新进行分析的方法测定了浓度为 50 pg/mg 的药物提取物的稳定性。保存温度为 4 °C。将响应值与第一天分析获得的结果进行比较。

实样分析应用

作为各种正在进行的研究工作的一部分，我们的实验室收到了作为研究目的的毛发样品和能力验证样品。

LC/MS 方法详细说明

LC 条件

安捷伦 1200 系列二元泵，脱气机，温控多孔板自动进样器和柱温箱。

色谱柱: Agilent ZORBAX XDB,
4.6 x 50 mm, 1.8 µm
(部件号 922975-902)

柱温: 40 °C

流动相: A = 20 mM 醋酸铵 (pH 6.4)
B = 甲醇

流速: 0.9 mL/分钟

进样量: 2 µL

梯度:

时间 (分钟)	%B	流速 (mL/分钟)
0.0–1.5	30	0.9
4.5	55	1
5	60	1
7	75	1

Stop time: 7 分钟
Post time: 6 分钟
注射针清洗 (75:25 甲醇/水): 冲洗进样针口 2 秒

MS 条件

Agilent 6410 三重串联四极杆质谱仪 (QQQ)

模式: 使用 Agilent G1947B 离子源的
APCI 正离子模式

汽化口温度: 400 °C

干燥气流速: 5 L/min

干燥气温度: 350 °C

雾化器: 50 psig

V_{cap}: 4500 V

电晕针: 4 µA

分离度 (FWHM): Q1 = 2.5 amu ; Q2 = 0.7 amu

所有 MRM 的驻留时间 = 50 毫秒

选择两次转变并用流动注射分析对每种药物进行优化。一个需要优化的参数是碰撞解离电压，位于离子源和 QQQ 质量分析器之间。该电压需要优化以获得母离子向质量分析器的第一级四极杆的最大传递。对于所有的化合物，该电压设定为 120 V。

表 1 显示每种前体离子 (M + 1) 产生定量和定性离子离子的最佳碰撞能量电压。接下来的分析均要求定量离子与定性离子之间的比值偏差在 ± 20% 以内，以符合阳性确证的标准。每个药物的离子比均在 100 pg/mg 的浓度水平进行计算。

表 1. MRM 模式参数 (括号中为定性离子数值)

片段	化合物	裂解转变	碰撞能量 (V)
1 (0 分钟)	苯甲酰芽子碱	290.3 > 168.3 (105.3)	15 (15)
	D3-苯甲酰芽子碱	293.3 > 171.4	20
2 (3.2 分钟)	未用		
3 (4 分钟)	可卡因	304.3 > 182.3 (82.2)	20 (25)
	D3-可卡因	307.3 > 185.3	20
4 (4.9 分钟)	可卡乙碱	318.3 > 196.4 (82.2)	25 (25)
	D8-可卡乙碱	326.3 > 204.4	20
	去甲可卡因	290.3 > 168.3 (136.3)	15 (25)
	D3-去甲可卡因	293.3 > 171.4	15

结果和讨论

方法开发

本文报道了用于检测毛发中可卡因及其代谢物的 LC/MS/MS 简便分析方法的开发。虽然这些滥用药物在毛发中被检出，但随着 LC/MS/MS 在实验室中的应用日益增多，有必要及时进行确证方法的开发。本文中对第二种定性离子的监测首次报道于可卡因的毛发分析，对于提高被分析物鉴定的可信度很有必要。一个例子如图 2 所示。

方法验证

可卡因、BZE、CE 和 NC 的色谱学方法按公认的协议进行验证。每个药物及校正曲线数据的定量限按实验部分所述进行计算。对于所有药物，在 25 ~ 10,000 pg/mg 毛发的浓度范围内呈线性，平均相关系数 $R^2 > 0.99$ 。以 CE 为例，见图 3。

平均值的相关性、线性校正曲线方程，以及监测到的定性离子比见表 2。BZE 的第二种转变的低强度 (6.7 ~ 10%) 限制了本方法分析此药物的灵敏度；然而，对于法医鉴别而言，选择定性转变的重要性远远超过了灵敏度。

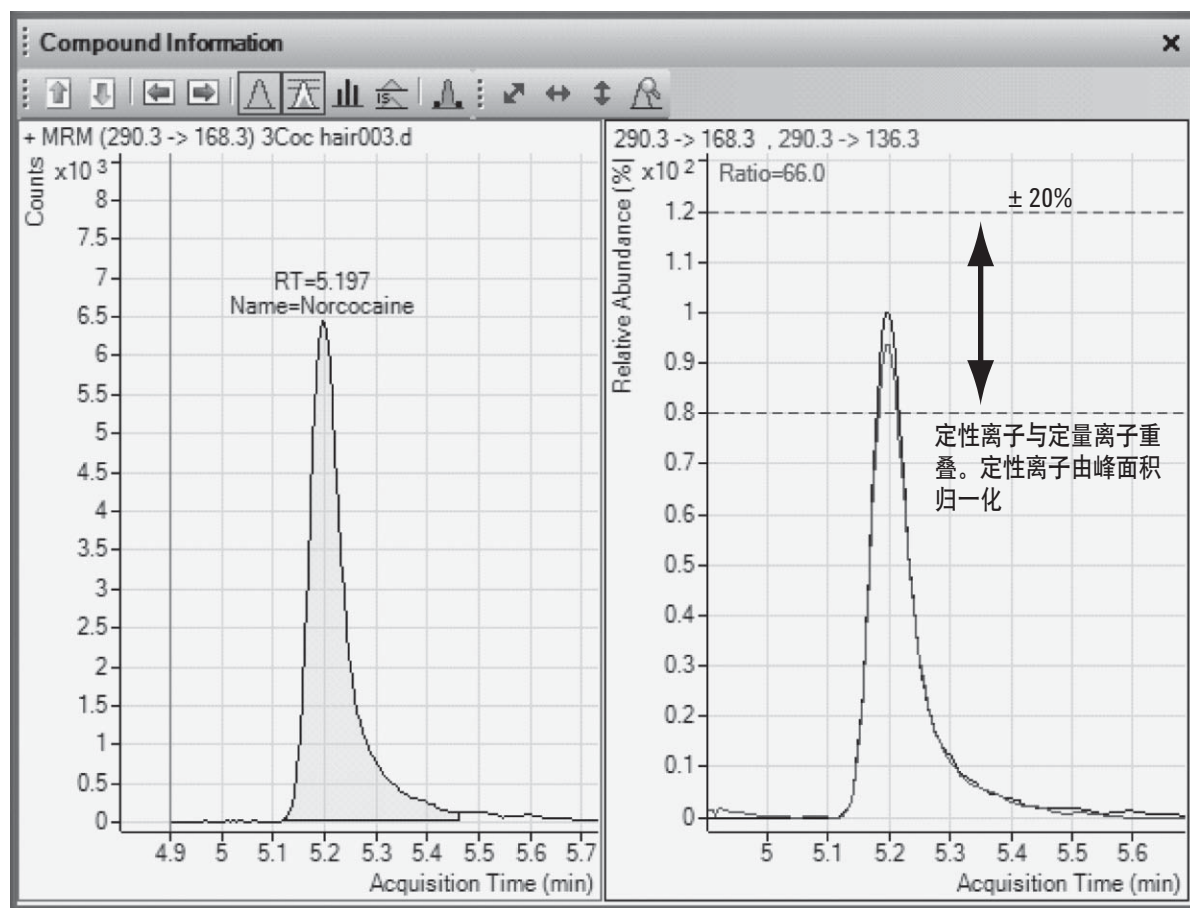


图 2. 100 pg/mg 水平去甲可卡因的离子比确证

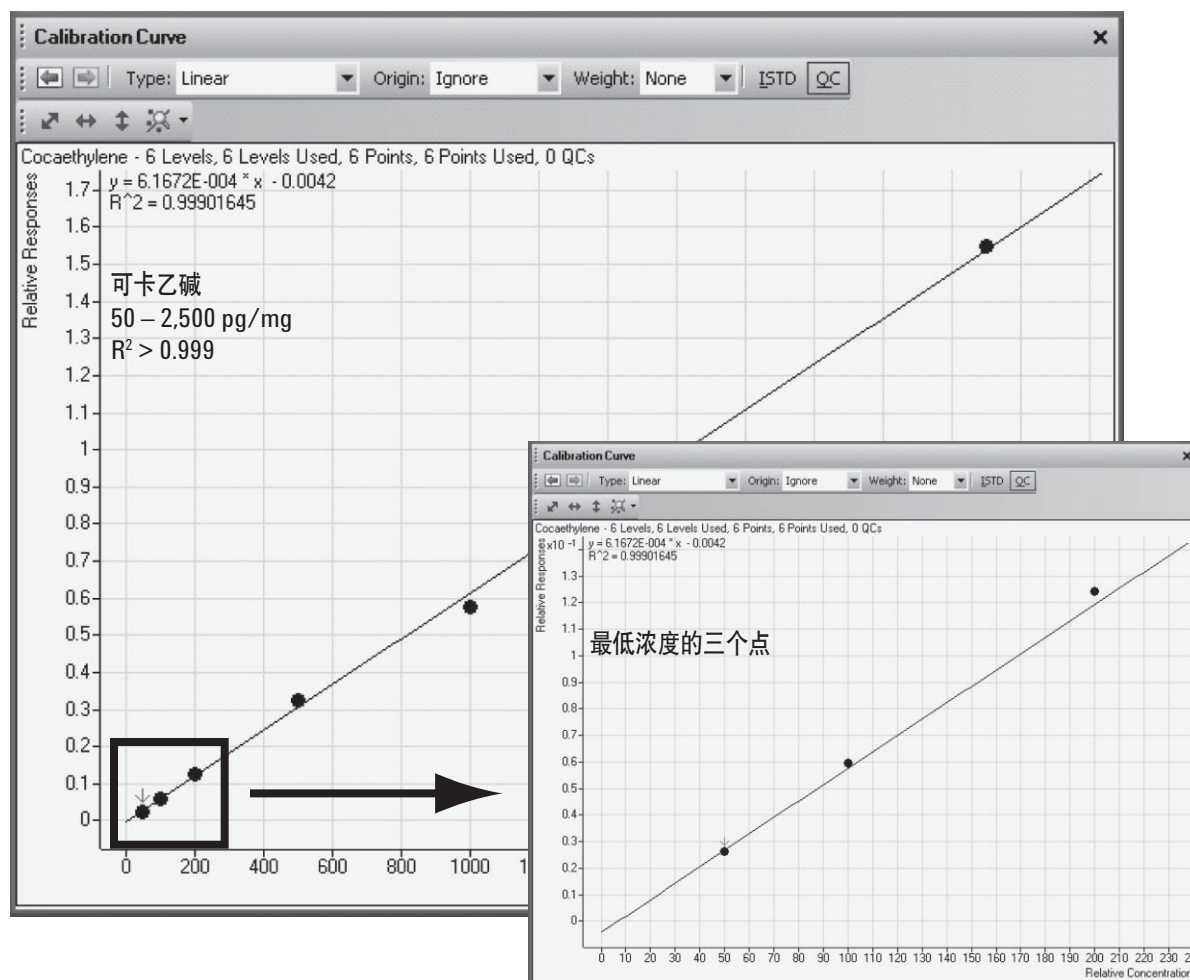


图 3. 可卡乙碱的线性，在低浓度水平的放大图显示极好的准确度

表 2. 平均值的相关性、线性校正曲线方程，以及监测到的定性离子比

药物	平均值的相关性 (n = 3)	校正曲线方程	定性离子的允许 强度范围
苯甲酰芽子碱	0.9989	$y = 0.00116x$	6.7–10%
可卡因	0.9995	$y = 0.00106x$	37.8–56.8%
可卡乙碱	0.9987	$y = 0.00061x$	49.3–74%
去甲可卡因	0.9992	$y = 0.00096x$	52.8–79.2%

采自不含滥用药的毛发样品显示对以上任何分析方法均无干扰，这并非意想不到的结果，因为这些药物不太可能与毛发中的内源性物质相类似。对于外源性干扰，通常遇到的滥用药的研究如实验部分所述。在这些裂解转变监测中未观测到色谱干扰。

图 4 显示一个 50 pg/mg 浓度水平提取的毛发样品的例子。如前所述，通过重复测试以计算日间和日内分

析精密度。对于 BZE，可卡因，CE 和 NC，其日间精密度分别为 9.2%，4.8%，15.7% 和 12.6% (n = 10)。日内精密度值分别为 8.1%，1.3%，0.8% 和 0.4%。最后，考察了滥用药在采集系统的稳定性和提取物的稳定性。提取物存放在温度保持 4 °C 的自动进样器仪器架中，至少 2 天内是稳定的。48 小时后，提取物的定量结果差值在 5% 以内。

实样分析

本方法应用于实验室收到的能力验证样品。测试结果非常出色，所有的含量结果与能力验证组织者确认的组平均值相比，偏差均在 10% 以内。

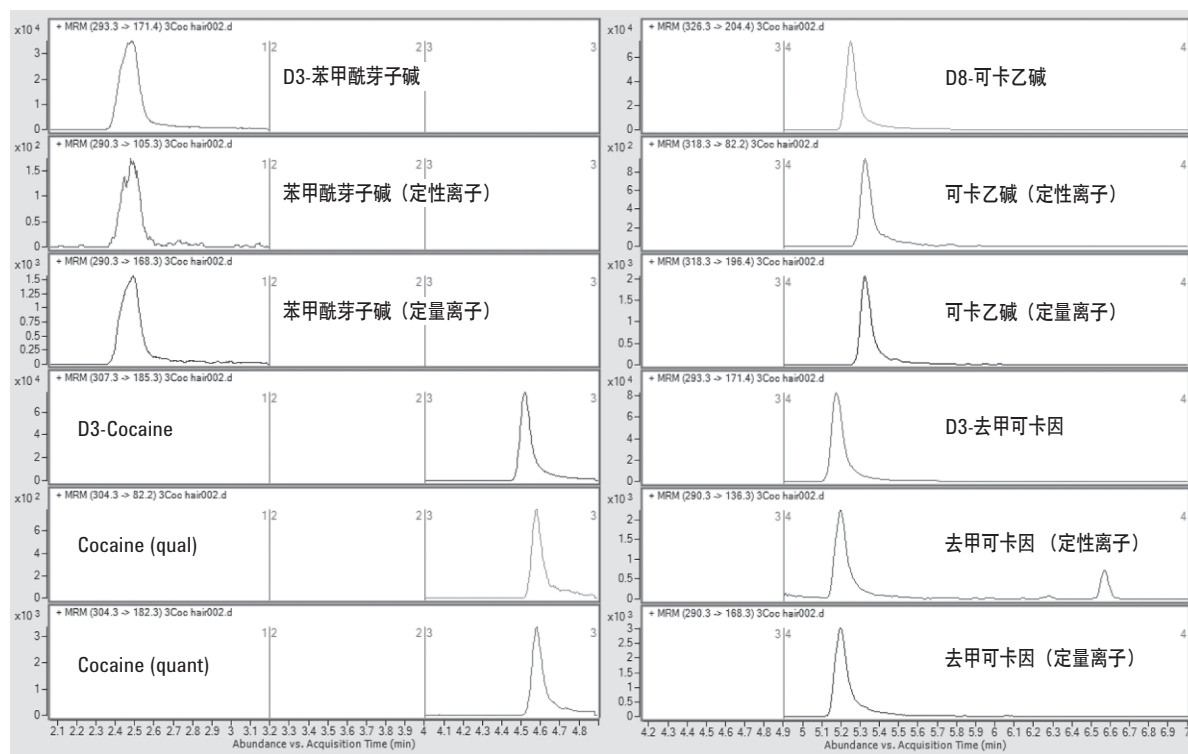


图 4. 50 pg/mg 浓度的毛发样品中所有化合物的色谱图

结论

本文阐述了毛发中可卡因、BZE、CE 和 NC 的检测方法。LC/MS/MS 方法是可重现的、稳定的、精密的。分析方法中包括了对定性转变的监测，并计算比值，要求其已知校正标准品相比的偏差在 20% 以内，从而进行有效的确证。该方法易于与常规的实验室检测方法相结合。

参考文献

1. F. S. Romolo, M. C. Rotolo, I. Palmi, R. Pacifici, A. Lopez, *Forens Sci Int* 138 (103) (2003) 17
2. P. Kintz, P. Mangin, *Forens Sci Int* 73 (2) (1995) 93
3. E. Cognard, S. Rudaz, S. Bouchonnet, C. Staub, *J Chromatogr B* 826 (2005) 17

4. J. A. Bourland, E. F. Hayes, R. C. Kelly, S. A. Sweeney, M. M. Hatab, *J Anal Toxicol* 24 (7) (2000) 489
5. M. Klys, S. Rojek, J. Kulikowska, E. Bozek, M. Scislawski, *J Chromatogr B* 854 (2007) 299
6. K. B. Scheidweiler, M. H. Huestis, *Anal Chem* 76 (2004) 4358
7. B. Maralikova, W. Weinmann, *J Chromatogr B* 811 (2004) 21
8. S. S. Johansen, H. M. Bhatia, *J Chromatogr B* 852 (1-2) (2007) 338

更多信息

如需了解与我们的产品与服务有关的其他信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

如需了解更多与本应用说明有关的详情，请与安捷伦科技公司的 Michael Zumwalt 联系。

安捷伦对本资料中的错误，及因使用本资料所引发的相关损失不承担责任。

本资料中的信息、说明和性能指标如有更改，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2007

中国印刷
2007 年 8 月 15 日
5989-7212CHCN



Agilent Technologies