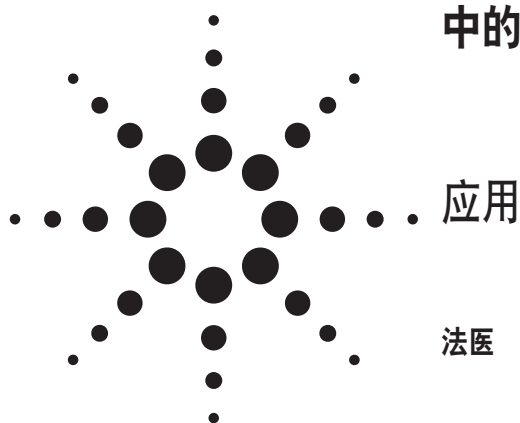


高分离度快速液相色谱 — 质谱/质谱对尿样中的阿片类化合物进行定量分析



作者

Sheher Mohsin
Agilent Technologies, Inc.
10 N. Martingale Rd., Suite 550
Schaumburg, IL 60173
USA

Yanan Yang
Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA 95051
USA

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

摘要

Agilent 6410 三重串联四极杆质谱仪 (QQQ) 被用于尿样中阿片类化合物的分析。通过使用包括 **ZORBAX C18** 柱 (2.1×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$ 粒径) 的快速分离高通量色谱法, 运用普通的液相色谱等度洗脱方式, 在 3.5 分钟内检测出所有七个被分析物及其相应的内标物质, 并按照定性离子与定量离子的比值在 $\pm 20\%$ 以内的要求对每个被分析物的定量离子和定性离子进行了监测, 以确定被分析物在样品中是否存在。所有校正标准品从基质中提取出来, 且除 6-乙酰吗啡 (6-MAM) 以

外的其他被分析物在尿样中的线性浓度范围为 $1 \sim 150 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 。6-乙酰吗啡的线性浓度范围是 $0.067 \sim 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 。提取之后, 被分析物的浓度降低, 对应的降低系数为 6.78, 因此, 进样的浓度范围即减为 $0.147 \sim 22.12 \text{ pg}/\mu\text{l}$, 或 $147 \text{ ppt} \sim 22.12 \text{ ppb}$ 。对于 6-乙酰吗啡而言, 相应的进样浓度减为 $9.8 \text{ ppt} \sim 1.5 \text{ ppb}$ 。所有的化合物均显示出非常好的线性 ($R^2 > 0.99$)。

引言

阿片类化合物是一类药用化合物, 通常用于镇静和缓解疼痛, 既可能作为处方药合法地获得, 也可能通过非法手段获取。阿片类化合物的滥用常常会导致成瘾。出于一些原因, 包括治疗药物监测、在药物影响下驾驶以及工作场所药物测试等, 通常会对这些化合物进行分析, 尤其是对尿样进行分析, 因为尿样易于获得且样品量充足。在法医领域的检测中, 如果该类化合物的含量超过管制值, 还需要提供另外的确证信息以证明它们的存在。

三重串联四极杆质谱仪 (QQQ) 能够提供灵敏度最高的定量方式, 即采集由被分析物母离子裂解产生的具有最高响应的子离子 (定量离子) 的相关信号。这种裂解转变被称为多反应监测 (MRM)。其次, 通过采集次高响应的子离子 (定性离子) 的附加信号, 可以认为能够获得足够的结构确证信息, 尤其是当两种子离子的信号比在校正标准品和未知样品中保持一致时更是如此。使用 QQQ 同时采集定量离子和定性离子的 MRM 信号能够同时得到定量测定和结构确证结果。



Agilent Technologies

安捷伦 MassHunter 软件在其定量分析程序中包含用户自定义离子比确证信息，如图 1 所示。用于确证的裂解离子比的缺省偏差限值为 $\pm 20\%$ ，对于特殊用户，该值也可由用户自己设定。另外，最多可有四个不同的子离子被设为定性离子。本文中，使用了缺省值 $\pm 20\%$ 且仅用一个定性离子。

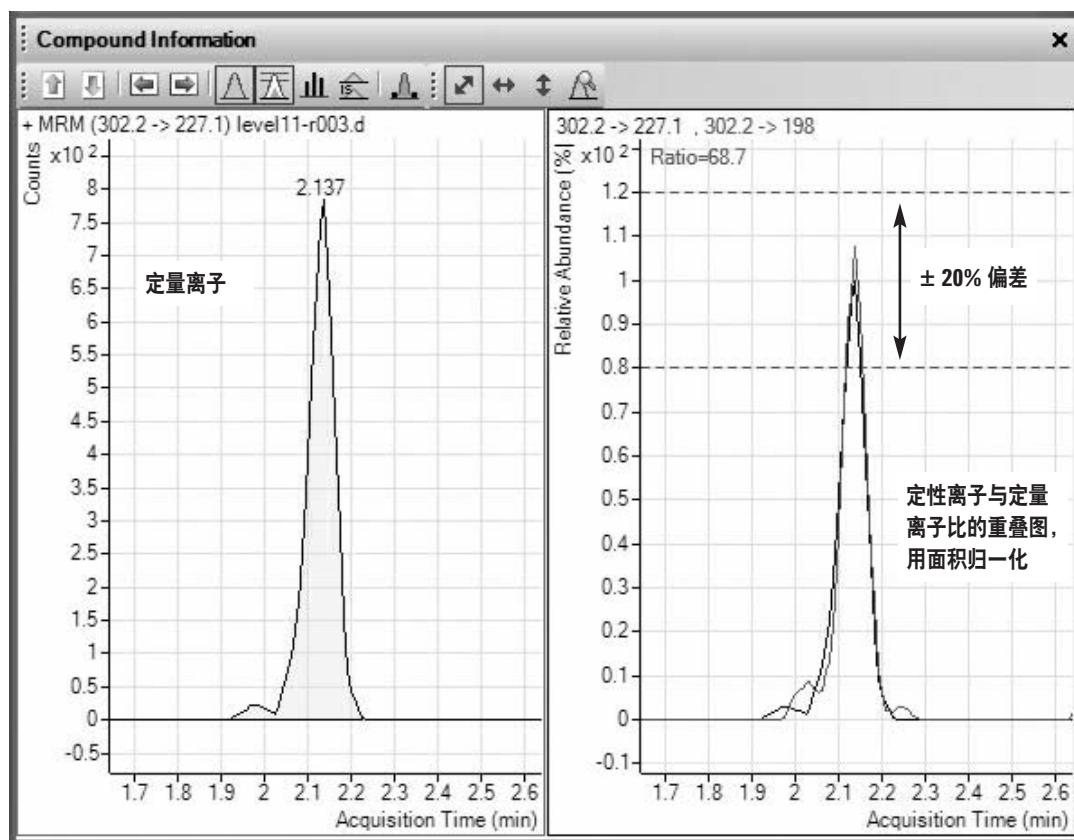


图 1. 用于确证羟吗啡酮的定性/定量离子比

本文中分析了尿样中的一些阿片类化合物, 包括吗啡、羟吗啡酮、氢吗啡酮、可待因、氧可酮、二氢可待因酮和 6-乙酰吗啡 (6-MAM, 海洛因的一种代谢物)。相应的结构式如图 2 所示。每个化合物均利用其氘代化学类似物进行提取效率和基质干扰的考察。对每种内标物质没有必要都设定定性离子, 因此未作分析。

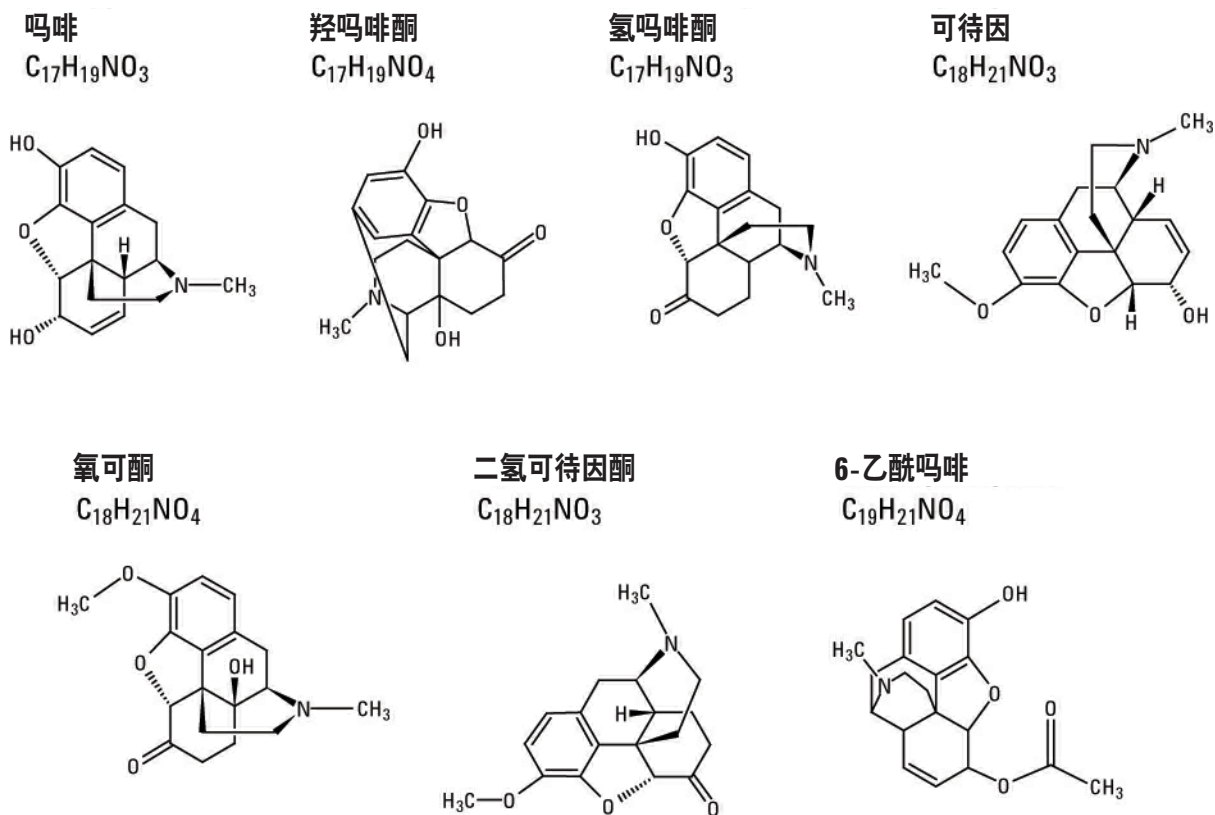


图2. 本文中分析的阿片类化合物的结构式

本文使用梯度液相色谱系统，在 $1.8\ \mu\text{m}$ 粒径的快速分离高通量（RRHT）色谱柱上，在 3.5 分钟内对所有被分析物和相应的内标物质进行洗脱，所用的流动相仅包含水和乙腈（不含改性剂）。从一次进样到下一次进样之间的完整周期约为 8 分钟。这些化合物使用电喷雾离子源以正离子模式进行分析。与该离子源有关的参数如干燥气，与液相色谱的流速 0.4ml/min 相适应，样品将由此导入质谱仪。

从离子源向 QQQ 质量分析器的最大离子转移电压由仪器的自动调谐功能进行设置，可以在较宽的质量范围内获得优化的信号强度、分离度和质量确证。一个需要根据每个被分析物进行优化的参数是碰撞诱导解

离电压，它位于离子源和质量分析器之间的离子转移光学元件之上。通过优化，能够使得 QQQ 质量分析器中第一个四极杆上的母离子响应值最大。本次研究中采用 110 V 的碰撞诱导解离电压，该参数对所有被分析物效果最佳。

这些参数设定之后，即可获得将母离子裂解形成最高响应的子离子的最优碰撞能量。至此，关于定量离子的质谱方法学研究工作结束。接着，对次高丰度的子离子的碰撞能量重新进行优化，以上两种 MRM 是由同一化合物裂解而来的。上述优化步骤可以通过流动注射分析进行。

实验部分

样品制备

添加阿片类化合物的尿样有以下标示浓度：1，5，10，50，100 和 150 pg/μL，而 6-MRM 的标示浓度要低 15 倍。这些样品按下述步骤进行处理：

1. 起始样品量为 250 μL
2. 加醋酸钠缓冲液 500 μL
3. 加葡萄糖苷酸酶 20 μL
4. 加浓度为 500 ng/mL 的内标混合物（去离子水溶液）75 μL
5. 涡旋振荡
6. 60 °C 保温 2 小时
7. 加去离子水 850 μL
8. 涡旋振荡并离心
9. 取上清液 200 μL 至样品瓶中

所有制备好的样品均由客户提供。

经过以上处理步骤，样品浓度稀释因子为 6.78，因此原尿样中 1 pg/μL 的浓度，其处理后进样的实际浓度为 147 fg/μL。通过加入内标物质和提取，各起始浓度的尿样其对应的进样浓度如下：0.147，0.737，1.47，7.37，14.7 和 22.12 pg/μL。按进样量 5μL（参见色谱条件）计算，以上浓度对应的柱上含量为 0.737，3.685，7.35，36.85，73.5 和 110.6 pg。对于 6-乙酰吗啡，各浓度值均为以上数值除以 15。

LC/MS 方法详细说明

LC 条件

Agilent 1200 系列二元泵，脱气机，多孔板进样器，以及柱温箱。
色谱柱：安捷伦 ZORBAX SB-C18，2.1 x 50 mm，1.8 μm 粒径（部件号：822700-902）

柱温：50 °C

流动相：A= 水
B= 乙腈

流速：0.4 mL/min

进样量：5 μL

梯度：

时间（分钟）	%B	
0	2	
4	40	Stop time: 6.1 分钟
4.1	90	Post time: 2.0 分钟
6	90	
6.1	2	

进样针清洗（25:75 水/甲醇）—— 冲洗进样针口 10 秒

质谱条件

模式：使用安捷伦 G1948B 离子源的电喷雾离子化正离子模式

雾化器：60 psig

干燥气流速：11 L/min

干燥气温度：350 °C

V_{cap}：2000 V

分离度（FWHM）：Q1=0.7；Q2=0.7

所有 MRM 的驻留时间 =50 毫秒

所有转变的碰撞诱导解离电压 =110 V

每个化合物的 MRM 及其保留时间见表 1。圆括号中的子离子为定性离子，其保留时间也在圆括号中。注意：6-乙酰吗啡为 6-单乙酰基吗啡的缩写。

表 1. 阿片类化合物的 MRM 模式参数

区段	化合物	MRM 转变	碰撞能量 (V)	保留时间 (min)
1 (0 min)	D3-吗啡	289.2 > 152.1	75	1.851
	吗啡	286.2 > 152.1 (128.0)	75 (73)	1.862
	D3-羟吗啡酮	305.2 > 230.1	33	2.138
	羟吗啡酮	302.2 > 227.1 (198.0)	33 (55)	2.146
	D3-氢吗啡酮	289.2 > 157.1	50	2.379
	氢吗啡酮	286.2 > 185.0 (157.0)	33 (50)	2.385
2 (2.65 min)	D3-可待因	303.2 > 152.0	75	2.908
	可待因	300.2 > 152.0 (115.0)	75 (85)	2.912
	D3-氧可酮	319.2 > 244.1	30	3.109
	氧可酮	316.2 > 241.0 (256.0)	30 (27)	3.120
	D6-6-MAM	334.2 > 165.1	40	3.161
	6-MAM	328.2 > 165.0 (211.0)	40 (27)	3.168
	D3-二氢可待因酮	303.2 > 199.1	28	3.245
	二氢可待因酮	300.2 > 199.0 (128.0)	28 (73)	3.249

结果与讨论

所有七个化合物的校正曲线如图 3A 至 3G 所示，包括三个最低浓度的放大图。所有校正曲线由线性方程拟合而成，不强制过原点，权重设为 $1/x$ 。所有曲线的线性相关系数均不低于 0.99，并且在最低浓度水平

显示出良好的重现性和精密度。只有一个例外，即 6-乙酰吗啡，其最低浓度（柱上 49 fg）的三次进样中仅有两次有信号。然而，其对应的尿样浓度 $0.067 \text{ pg}/\mu\text{L}$ (0.067 ng/mL) 已远低于美国药物滥用与精神卫生服务管理局 (SAMHSA) 规定的工作场所测试管制值 10 ng/mL 。

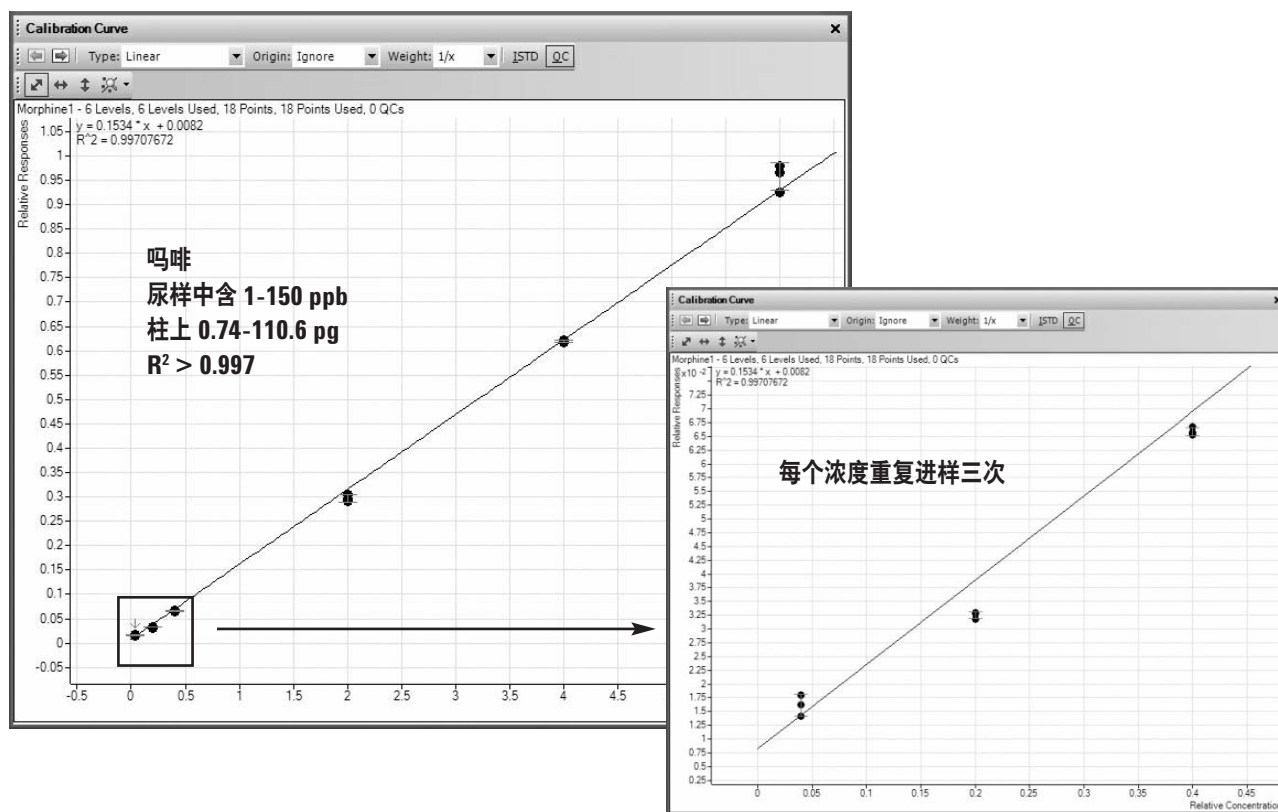


图 3A. 尿样中吗啡的线性。进样浓度范围为 147 ppt ~ 22 ppb

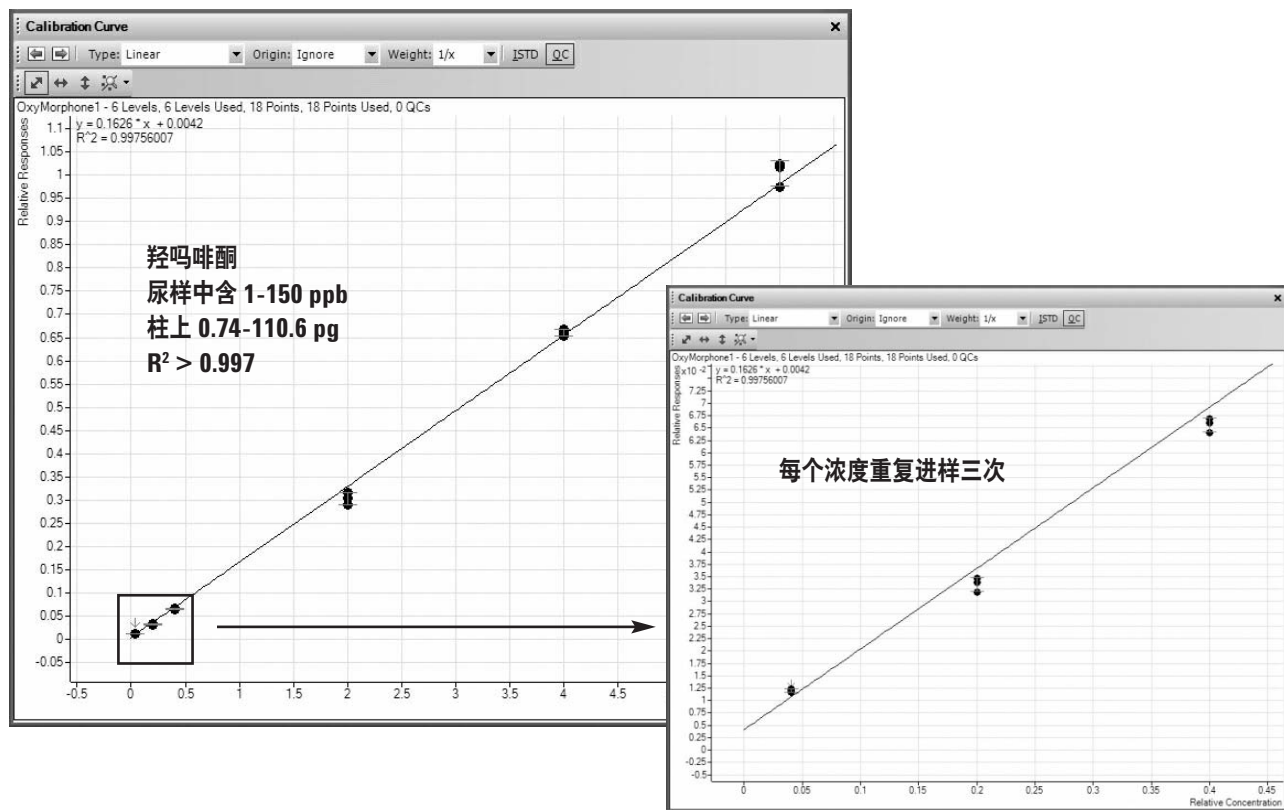


图 3B. 尿样中羟吗啡酮的线性。进样浓度范围为 147 ppt ~ 22 ppb

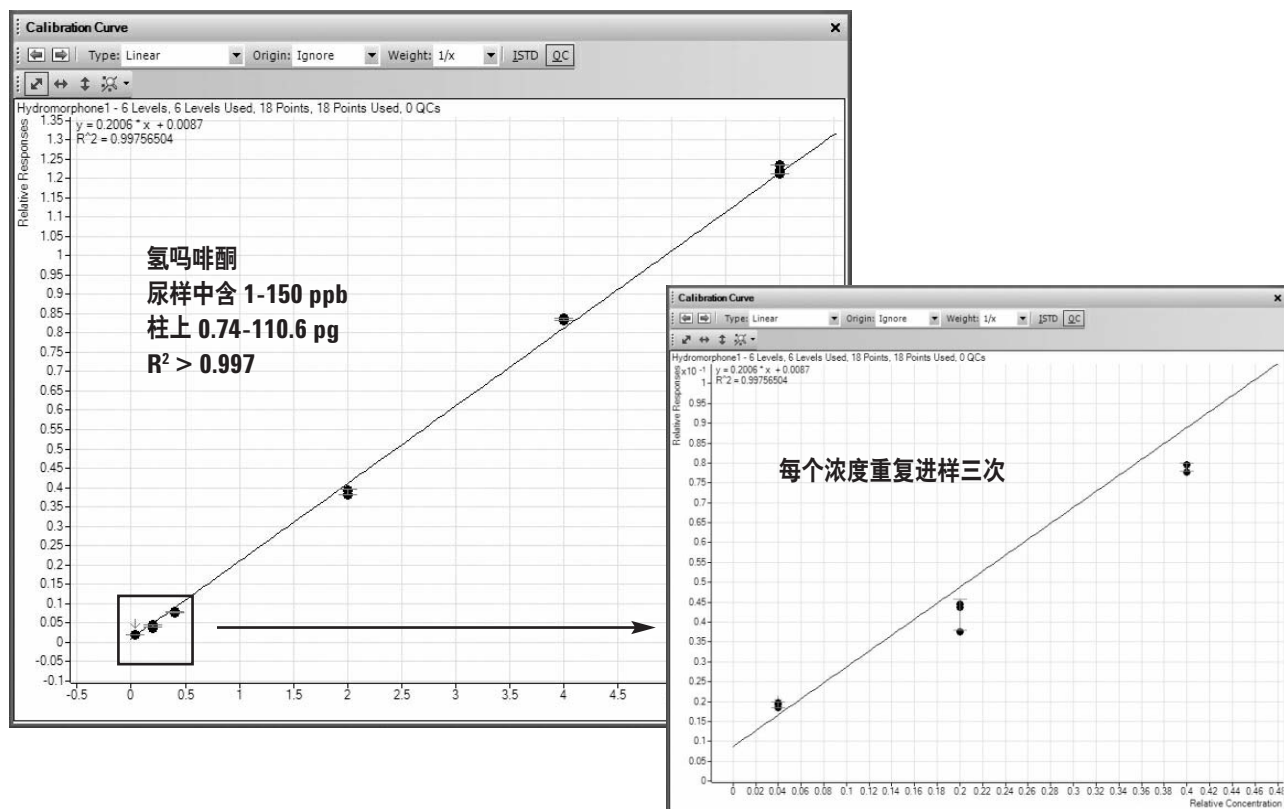


图 3C. 尿样中氢吗啡酮的线性。进样浓度范围为 147 ppt ~ 22 ppb

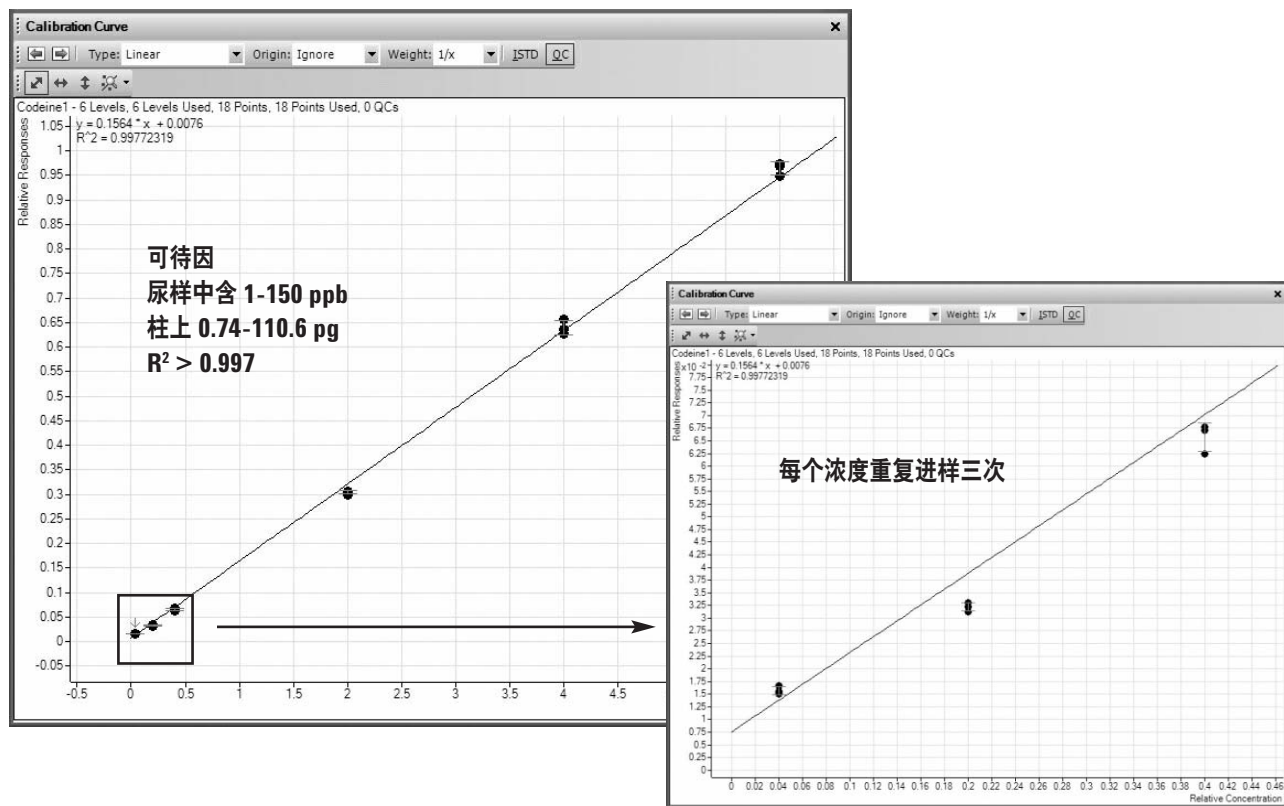


图 3D. 尿样中可待因的线性。进样浓度范围为 147 ppt ~ 22 ppb

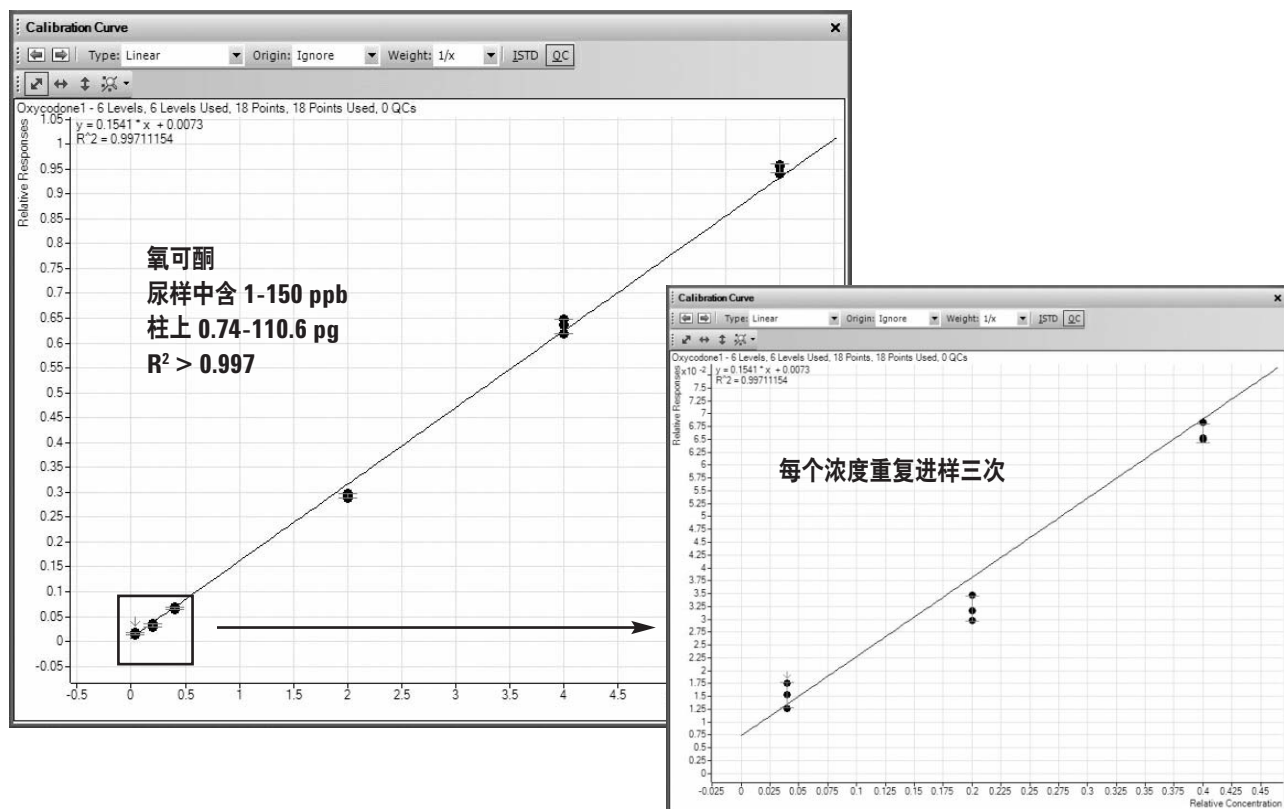


图 3E. 尿样中氧可酮的线性。进样浓度范围为 147 ppt ~ 22 ppb

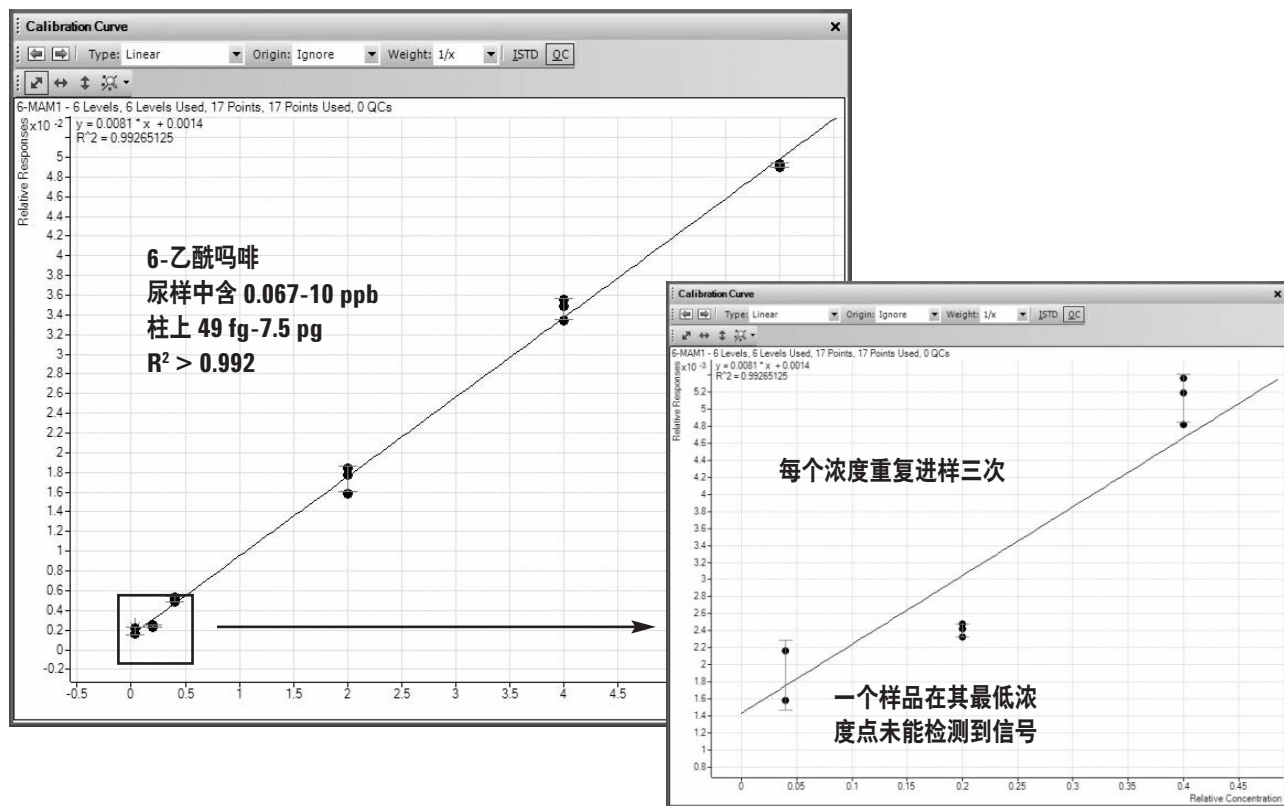


图 3F. 尿样中 6-乙酰吗啡的线性。进样浓度范围为 9.8 ppt ~ 1.5 ppb

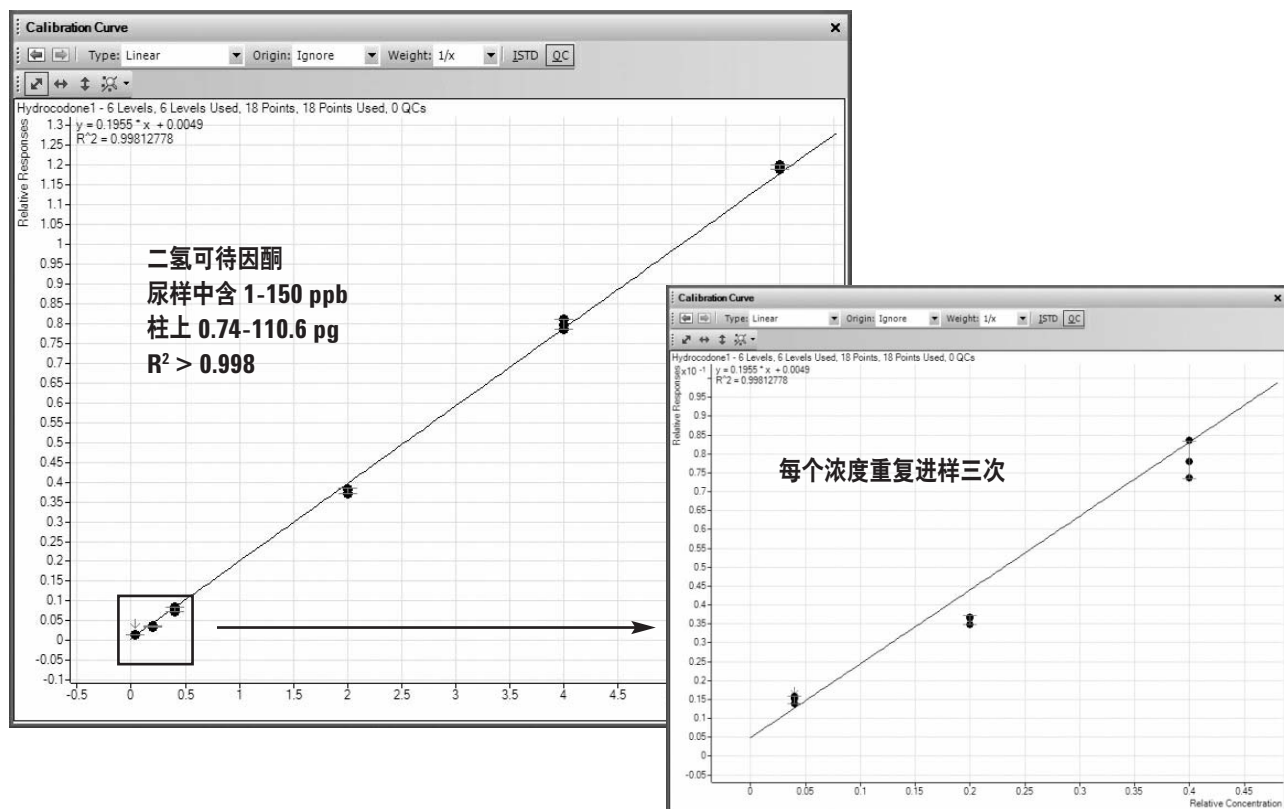
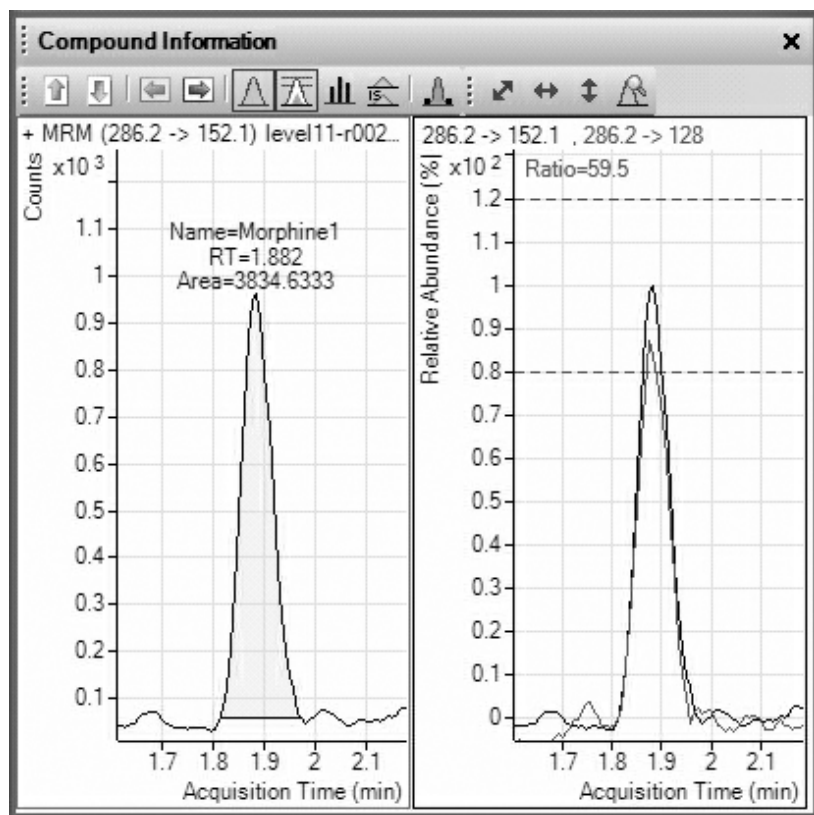


图 3G. 尿样中二氢可待因酮的线性。进样浓度范围为 147 ppt ~ 22 ppb

通过检验定性离子/定量离子比并证实该比值在各被分析物测定值的 $\pm 20\%$ 以内进行了结构确证。例如，在对吗啡的两个子离子进行了 MRM 转变的优化后，MassHunter 定量分析软件自动计算定性离子峰和定量离子峰之比可能是 0.7 或 70%。给该比值加上 $\pm 20\%$ 的允差，表明对于本批校正标准品和待测样品而言，如其定性离子/定量离子比在 0.56 到 0.84 之间，则能证实吗啡的存在。每个化合物的最低校正浓度水平仍能满足于确证条件，见图 4A 至 4G。

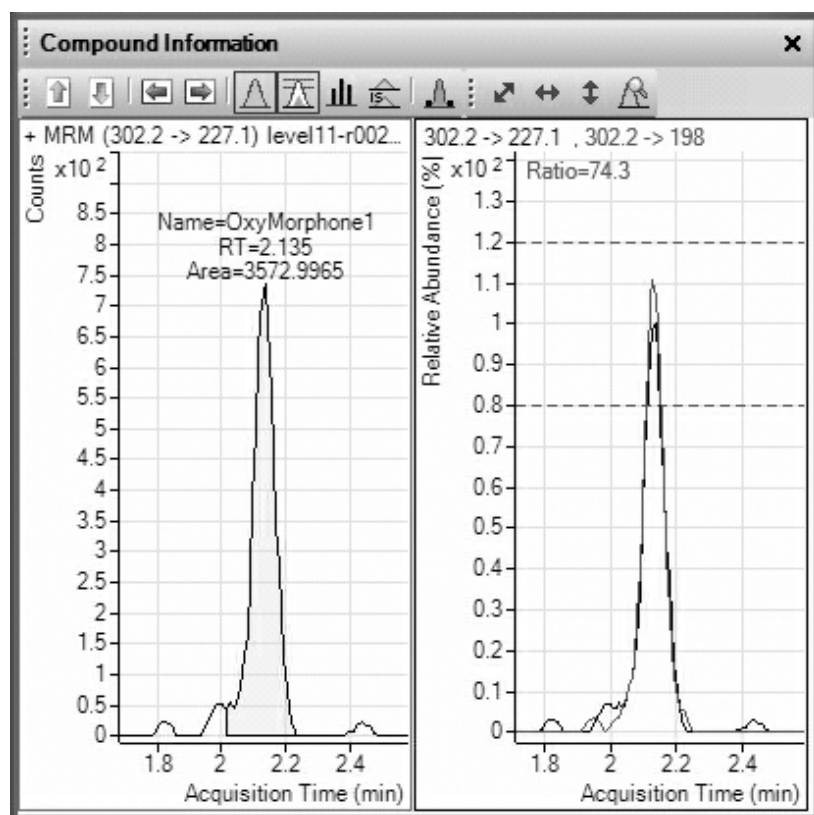
注意氧可酮和 6-乙酰吗啡是例外，所有其他被分析物的确证离子比在尿样的最低校正浓度水平 1 pg/ μ L 仍满足要求。对于氧可酮和 6-乙酰吗啡，其最低浓度分别为 5 pg/ μ L 和 0.3 pg/ μ L。

本次研究同时进行了检测限 (LOD) 的研究 (见图 5A 至 5G)，对每种被分析物的定量离子，根据直观地判断其峰与峰的信噪比不得低于 3:1 且峰面积的 %RSD (百分相对标准偏差) 在 30% 以内来确定其检测限。除了氧可酮和 6-乙酰吗啡外，其他被分析物都是基于柱上 147 fg 浓度水平的八次 1 μ L 进样结果计算的检测限。这一浓度水平相当于尿样的原始浓度为 1 pg/ μ L。对于氧可酮，其 LOD 是根据相当于 1 pg/ μ L 的校正浓度水平的三次 5 μ L 进样结果计算而得的 (见图 5E)。与氧可酮类似，6-乙酰吗啡的 LOD 也是在进样量为 5 μ L 时发现的，不同的是，其校正浓度水平为 0.067 pg/ μ L。然而，该浓度水平下三次 5 μ L 进样，仅有两次有信号，因此无法计算峰面积的 %RSD。各种被分析物的检测限均在表 2 中列出。



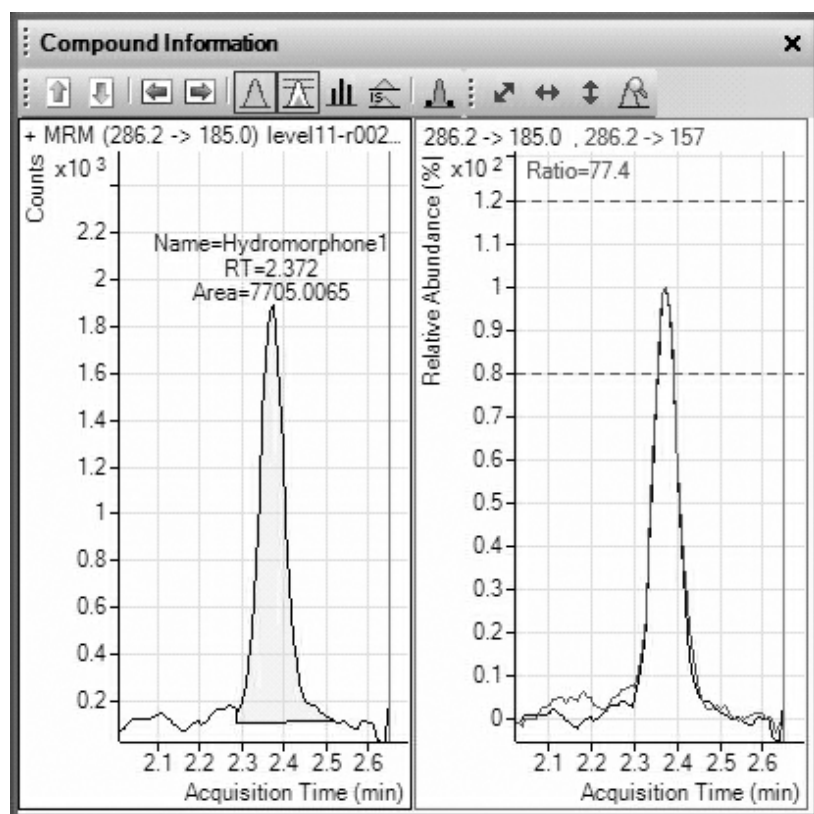
柱上 0.74 fg

图 4A. 在 1 pg/ μ L (147 fg/ μ L) 对吗啡的确证



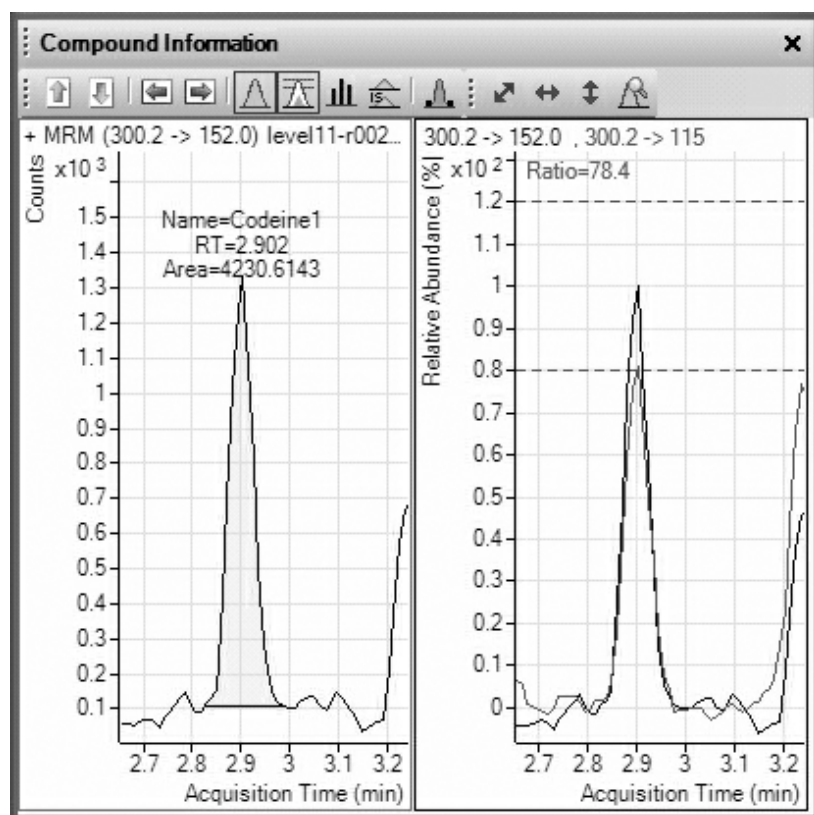
柱上 0.74 fg

图 4B. 在 1 pg/ μ L (147 fg/ μ L) 对羟吗啡酮的确证



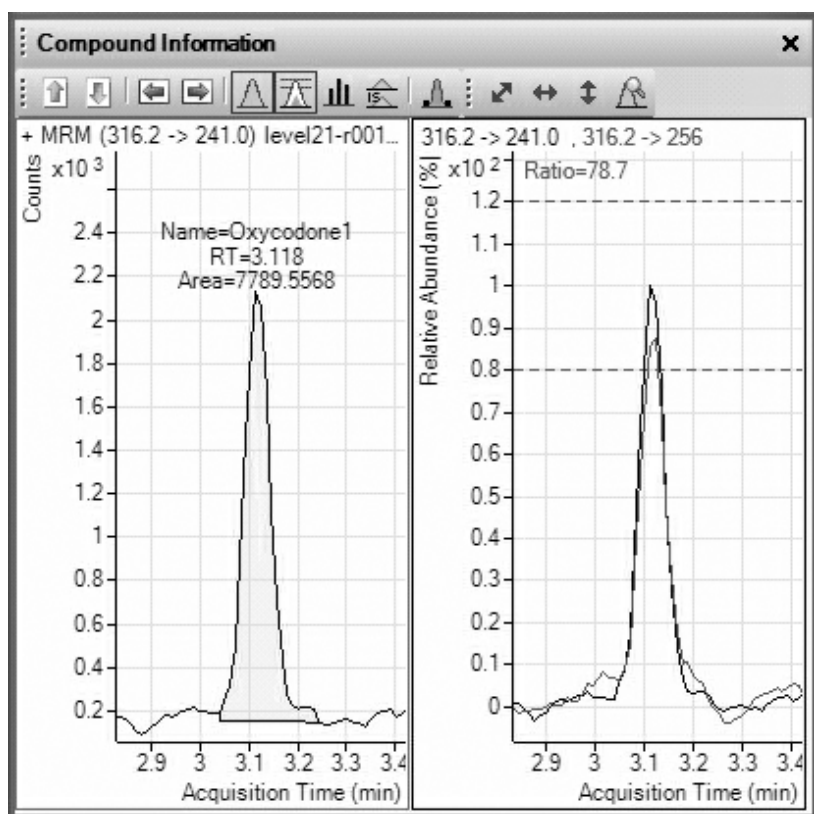
柱上 0.74 fg

图 4C. 在 1 pg/ μ L (147 fg/ μ L) 对氢吗啡酮的确证



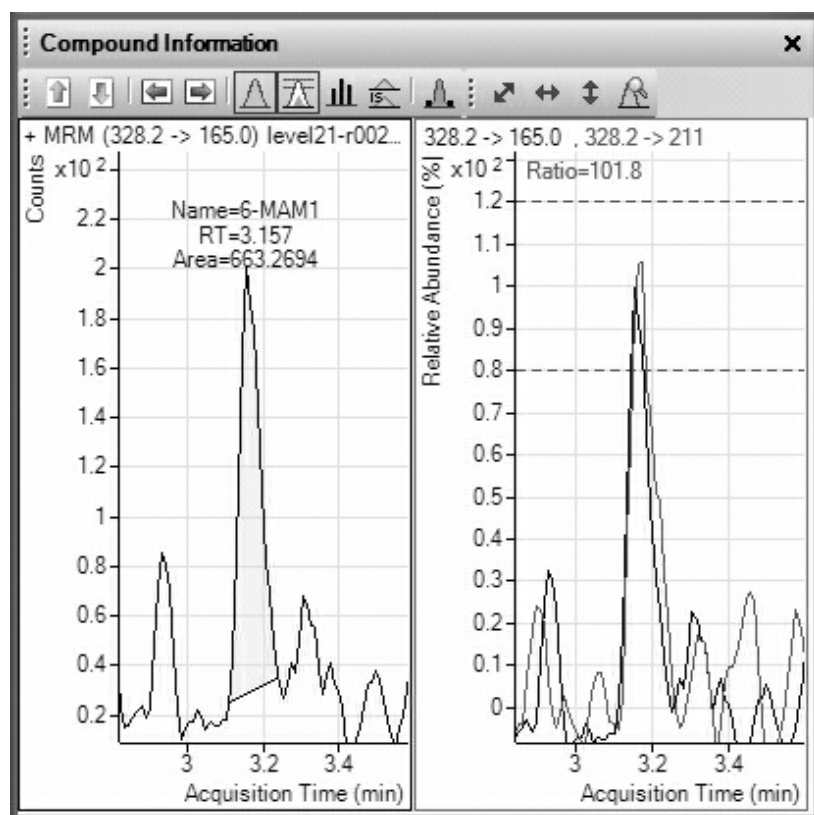
柱上 0.74 fg

图 4D. 在 1 pg/ μ L (147 fg/ μ L) 对可待因的确证



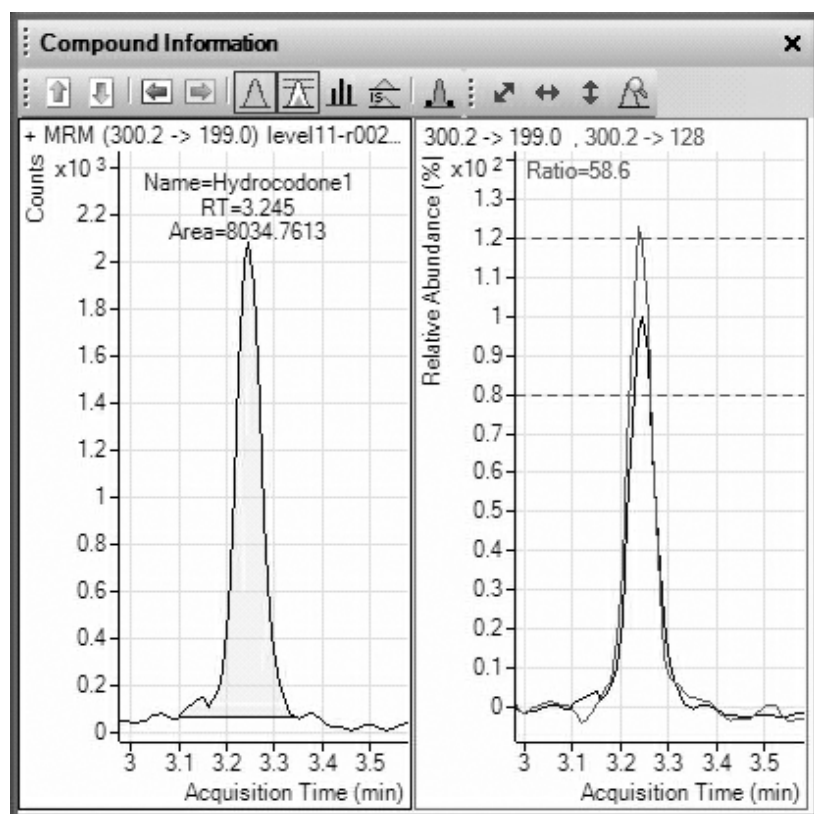
柱上 3.7 pg

图 4E. 在 5 pg/ μ L (737 fg/ μ L) 对氧可酮的确证



柱上 245 fg

图 4F. 在 0.3 pg/μL (49 fg/μL) 对 6-乙酰吗啡的确证



柱上 0.74 pg

图 4G. 在 1 pg/μL (147 fg/μL) 对二氢可待因酮的确证

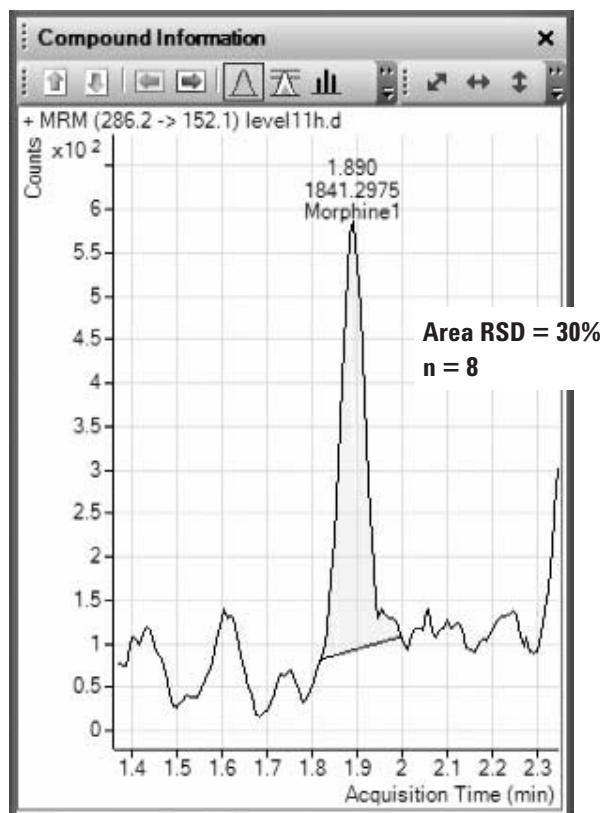


图 5A. 吗啡的检测限为柱上 147 fg

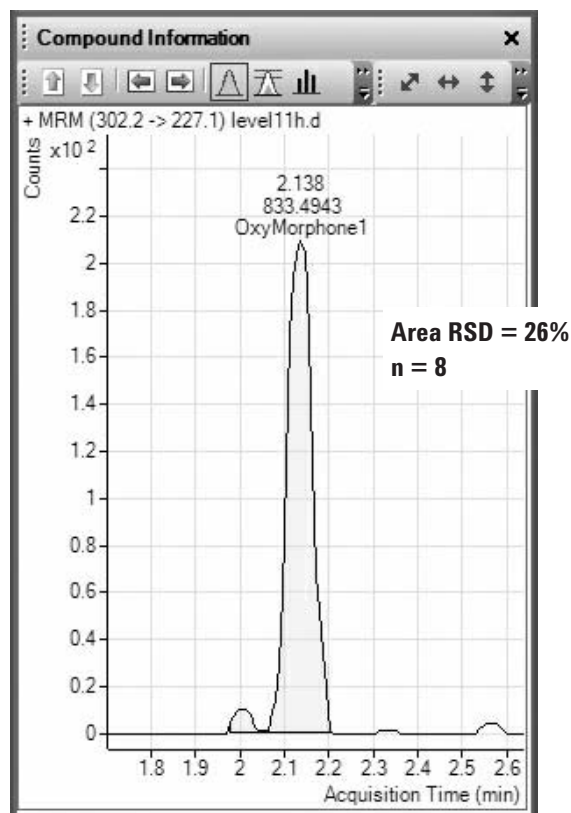


图 5B. 羟吗啡酮的检测限为柱上 147 fg

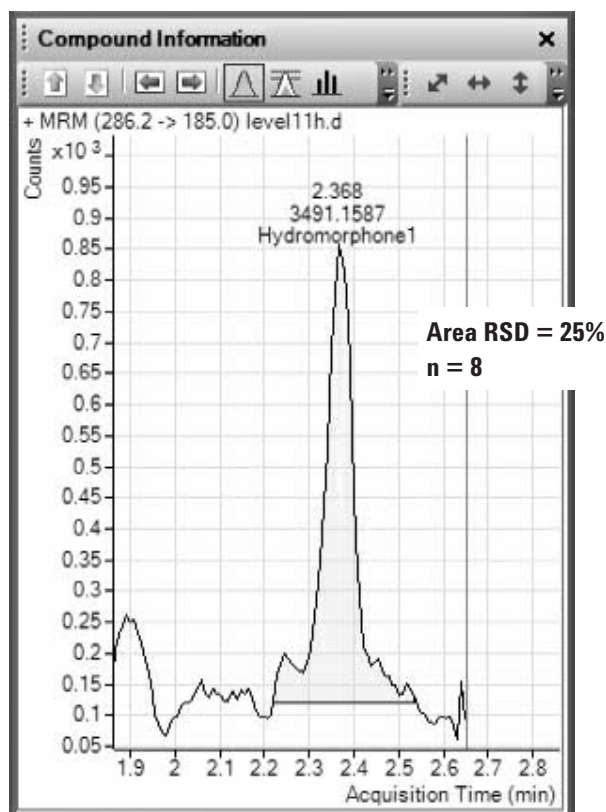


图 5C. 氢吗啡酮的检测限为柱上 147 fg

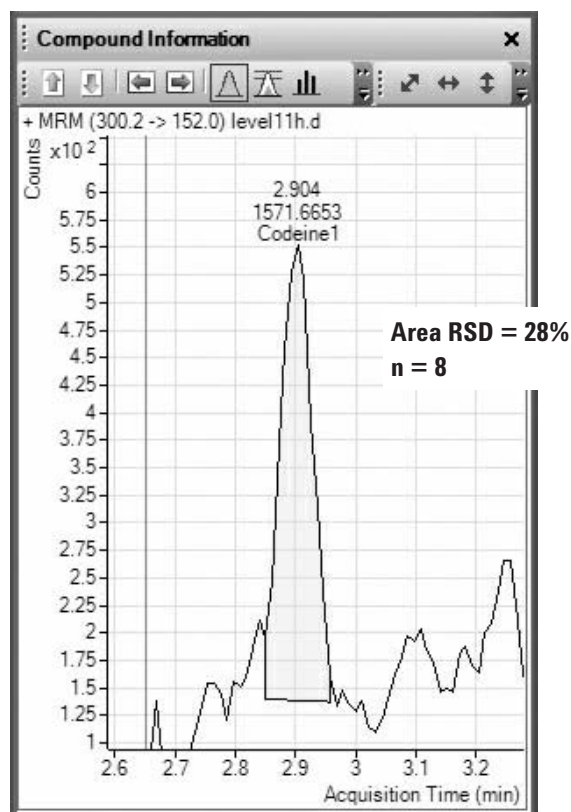


图 5D. 可待因的检测限为柱上 147 fg

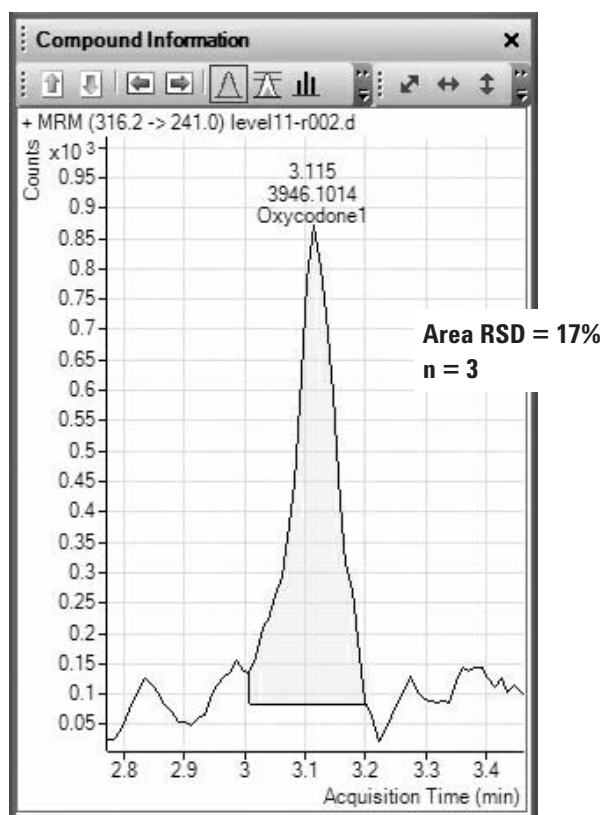


图 5E. 氧可酮的检测限为柱上 737 fg

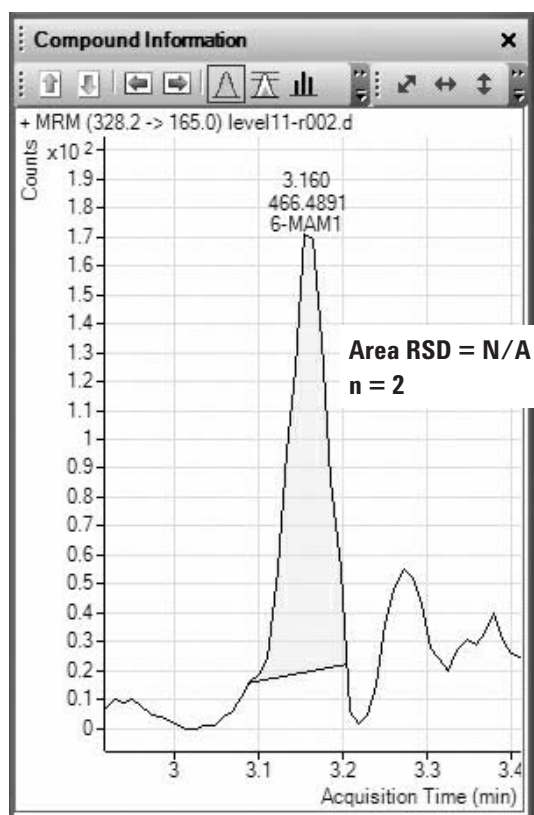


图 5F. 6-乙酰吗啡的检测限为柱上 49 fg。由于三次进样中只有两次有信号，无法计算峰面积的 %RSD

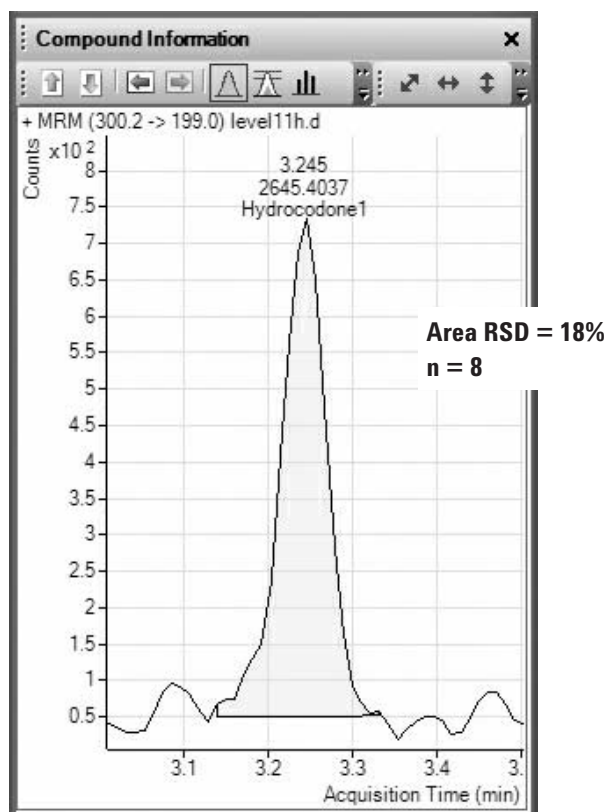


图 5G. 二氢可待因酮的检测限为柱上 147 fg

表 2. 尿样中各被分析物的检测限 (LOD)

被分析物	LOD (柱上 fg)
吗啡	147
羟吗啡酮	147
氢吗啡酮	147
可待因	147
氧可酮	737
6-乙酰吗啡	49
二氢可待因酮	147

结论

尿样中存在的阿片类化合物得到了成功的分析。所有化合物都在两个以上数量级的范围内表现出良好的线性 ($R^2 > 0.99$)，即除 6-乙酰吗啡外的六个被分析物的线性范围为 1 ~ 150 ppb；而 6-乙酰吗啡的线性范围为 0.067 ~ 10 ppb。样品经处理后，按进样量为 5 μ l 计算，以上线性范围相当于柱上 0.74 ~ 110.6 pg (6-乙酰吗啡为 49 fg ~ 7.5 pg)。校正曲线的拟合未强制过原点，拟合类型为线性，权重为 1/x。在最低浓度水平仍具有非常好的重现性和精密度也得到了证实。所有被分析物的检测限均低于柱上 1 pg。对于相当复杂的基质中被分析物的高精度定量测定而言，安捷伦 6410 三重串联四极杆质谱仪是非常出色的。

更多信息

如需了解有关我们的产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

如需了解本文中所述应用的详情，请联系安捷伦科技公司的 Michael Zumwalt。

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 8 日
5989-7213CHCN



Agilent Technologies