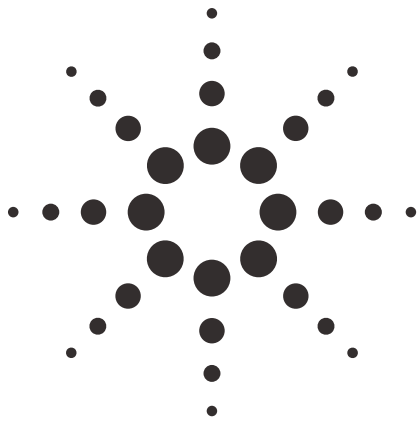


固相萃取和液相色谱-串联质谱检测技术测定唾液中的苯环利啉



应用

法医学

作者

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

For contact purposes only:

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

摘要

开发和验证了使用液相色谱-串联质谱检测技术对酶联免疫分析初筛后的唾液中苯环利啉进行测定的分析方法。用 Quantisal™ 装置收集唾液样品，并用混合模式固相萃取以及正离子模式大气压化学电离的质谱检测，对存在的药物进行定量测定。作为确证手段，监测了两组离子对并测定离子比率，该值应在已知校正标准品离子比率的 $\pm 20\%$ 范围内。对定性离子对的监

测，以及要求定性离子与主要裂解离子以一定的比例存在，有可能限制检测方法的灵敏度。然而，最终结果可靠性的提高以及应对法庭质询的能力显得更为重要。定量限为 5 ng/mL；检测方法的日内精密度的 3.04% (n=5)；日间精密度的 3.35% (n=5)。从唾液收集器中得到的苯环利啉回收率为 81.7% (n=6)。本方法已应用于熟练测试样品 (proficiency specimens) 和在美国进行研究时得到的样品。

引言

作为血液或尿液的可替代基质，唾液在标准药品检测中的应用越来越普遍，因为它易于收集，难以掺伪，而且分析技术的灵敏度不断提高，使以唾液为基质的检测能够实现。苯环利啉 (PCP) 包含于关于在工作场所进行唾液中药物检测的美国联邦法规提案中，建议的洁净唾液中浓度域值为 10 ng/mL。然而，尚无公开发布的使用液相色谱-串联质谱 (LC/MS/MS) 进行唾液中 PCP 测定的方法。不过，有一种方法用于大鼠血浆中 PCP 的分析 [1]。其他有关血液 [2]、尿液 [3]、毛发 [4] 和胎便 [5] 中 PCP 测定方法，使用更为标准的气相色谱-质谱仪。



Agilent Technologies

一些出版物说明了使用 LC/MS/MS 在 APCI 模式下对唾液中其它滥用药物的分析，与我们的方法有相似之处；然而，大多数这些方法仅用多反应监测模式 (MRM) 监测了一组离子对。最近，一些作者开始关注对第二组离子对进行监测的需求，计算主要离子和次要离子的丰度比值，提高最终结果的可靠性。Mara-likova 和 Weinmann 注意到使用 LC/MS/MS 进行验证性分析的指南尚未建立，因此建议要求监测至少两组离子对，才能对药物进行充分的鉴定。

对于唾液中药物的定量分析，最主要的困难在于确定收集到的样品量。目前可用的许多装置都无法显示已收集了多少唾液，如果不经实验室里的进一步处理，所提供的任何定量结果都是毫无意义的[7]。另外，具备收集板或用于唾液收集的其它材料的装置通常无法显示分析前从收集板中回收药物的量，仍然可能导致对定量结果的质疑。报告的药物浓度取决于所采取的样品收集方法[8]。

本文应用了 Quantisal™ 唾液收集装置，能够收集已知量的洁净唾液。对从收集板转移到缓冲液中的 PCP 回收率进行了测定，以增强定量结果的可靠性。在室温和 4 °C 条件下对缓冲液中药物的稳定性以及唾液样品提取物的稳定性进行了研究。

我们验证了唾液中 PCP 的测定方法，通过样品量、收集板中的药物回收率以及对两种裂解反应进行监测的 LC/MS/MS 可以看出，该方法所得的结果具有应对法庭质询的能力。该方法已被应用于我们实验室从熟练测试项目样品和研究项目中得到的样品。

PCP 的结构式见图 1。

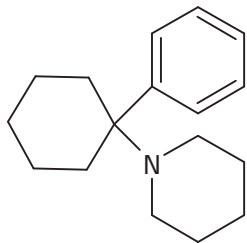


图 1. 苯环利啉 (PCP) 的结构式

实验部分

样品制备

唾液收集装置

用于收集唾液样品的 Quantisal™ 装置购自 Immuno-lysis Corporation (Pomona, CA)。该装置包含一个带有容量充满指示器的收集板，当收集到 1 毫升唾液 ($\pm 10\%$) 时，指示器变为蓝色。然后，把收集板置于 3 mL 转移缓冲液中，用于分析的总样品量即为 4 mL (3 mL 缓冲液 + 1 mL 唾液)。当样品对不只一种药物显阳性且用于分析的样品量可能不足时，做到这一点尤其有利。使用 Quantisal™ 收集装置时，唾液的浓度稀释为 1:3，检出的药物浓度应进行相应的计算和调整。

标准品与试剂

用于筛查唾液样品的 Phencyclidine Direct ELISA 试剂盒 (目录号 #208) 购自 Immunoanalysis Corporation (Pomona, CA)。用于验证试验的五氘代内标 (苯环利啉-d5) 和未标记的药品标准品购自 Cerilliant (Round Rock, TX)。固相萃取柱 (Clin II, 691-0353T) 购自 SPEWare (San Pedro, CA)。所有溶剂均为 HPLC 级以上，所有化学试剂均为 ACS 级。

校正品

将氘代内标用甲醇溶解并制成 250 ng/mL 的工作溶液，用作色谱校正标准品。未标记的药品标准品用甲醇制成相同浓度的溶液。所有工作溶液不用时置于 -20 °C 保存。在对每批样品进行检测时，取四份不同量的校正标准品分别加到 1 mL 合成唾液中，再加入 Quantisal™ 收集装置的转移缓冲液 3 mL，制成相当于洁净唾液中药物浓度分别为 5, 10, 20 和 40 ng/mL 的校正标准溶液 (内标浓度: 20 ng/mL)。

筛查分析

酶联免疫分析 (ELISA) 技术基于抗体与酶标抗原和未标记抗原的竞争性结合, 结合的量与未标记抗原在反应孔中的浓度成一定比例。按照 ELISA 试剂盒生产商的说明对唾液样品进行筛查, 推荐的苯环利啶截止浓度为 10 ng/mL (相当于洁净唾液中的浓度)。在每批样品测试的同时, 测定的标准曲线由一份无毒的唾液样品和以无毒唾液样品制成浓度为推荐截止浓度的 50% 和 200% 的加标样品组成。生产商建议的最佳样品量为 10 μ L。从收集装置中直接吸取相应的样品量注入微板中。取经过 ELISA 筛查为阳性的样品, 用本文所述方法进行确证试验。

色谱分析的样品制备

从 Quantisal™ 收集装置中取一份样品 (1 mL), 相当于洁净唾液 0.25 mL, 加入内标溶液 20 μ L。在每份校正品、控制品和唾液样品中分别加入 pH 6.0 的 0.1 M 磷酸盐缓冲液 1 mL。固相混合模式萃取柱 (Clin II, 691-0353T) 装在一个正压的多路连接管中。每个萃取柱用甲醇 2 mL 和 pH 6.0 的 0.1 M 磷酸盐缓冲液 2 mL 处理。取样品过柱, 然后用去离子水 1 mL、pH 4 的 0.1 M 醋酸盐缓冲液 1 mL、甲醇 1 mL 和乙酸乙酯 1 mL 分别洗柱。将萃取柱置于氮气流 (30 psi) 中干燥 2 分钟。最后用新制的乙酸乙酯-氨水溶液 (98:2 v,v) 2 mL 洗脱药物。所得的提取物在氮气流中挥发至干, 再以 20 mM 甲酸铵溶液 (pH 6.4) - 甲醇 (70:30 v/v) 40 μ L 溶解。

分析步骤

仪器:	Agilent 1200 系列 RRLC ; 6410 三重串联四极杆质谱仪
LC 条件:	
色谱柱:	ZORBAX Eclipse XDB C18, 4.6 mm x 50 mm x 1.8 μ m, (部件号 822795-902)
柱温:	40 °C
溶剂流速:	0.6 mL/min
流动相:	A = 20 mM 甲酸铵溶液, pH 6.4 B = 甲醇
进样量:	5 μ L

梯度:

时间 (分钟)	%B	流速 (mL/min)
0	25	0.9
1.5	30	0.9
4.5	55	1
5	60	1
7	75	1

停止时间 = 7 min ; 运行后时间 = 3 min

质谱条件:

运行模式:	正离子 APCI 模式
干燥气温度:	350 °C
气流速度 (N ₂):	5 L/min
雾化器压力:	50 psi
毛细管电压:	4500 V

多反应监测分析 (MRM) 的跃迁离子对见表 1, 同时给出了相应的保留时间。所有的离子对中, 用于前体离子的第一四极杆在宽分辨率或半峰宽 (FWHM) 为 2.5 amu 的条件下运行。用于产物离子的最后一个四极杆在单位分辨率或半峰宽为 0.7 amu 的条件下运行。最终, 每组离子对的驻留时间为 75 毫秒。

表 1. 苯环利啶及其氘代物 (D5, 作为内标) 的多反应监测分析 (MRM) 裂解反应

化合物	保留时间 (min)	MRM 裂解反应	碰撞电压 (V)	碰撞能量 (V)
PCP	6.1	244.3 > 91.2 (86.2)	40	25 (25)
PCP-D5	6.1	249.3 > 164.3	40	15

* () 定性离子; 定性离子比必须在校正值的 $\pm 20\%$ 范围内。

结果与讨论

数据分析

利用氘代内标进行校正, 在 5–40 ng/mL 浓度范围内按线性回归分析计算。使用 Agilent 的 MassHunter 软件计算目标分析物与内标物的峰面积比值。数据拟合为线性最小二乘回归曲线, 没有权重, 并且不强制通过原点。

方法开发

本文报告了检测唾液中苯环利啉含量的一种简便的 LC/MS/MS 测定方法的开发。由于这些药物在唾液中能够被检出，实验室中日益增多的 LC/MS/MS 应用使得这一验证方法的开发既必要又及时。第二种定性离子的监测对于提高被分析物鉴定结果的可靠性是很有必要，这对于唾液中 PCP 的分析是首次报道。

方法验证

按照已接受的协议对开发用于 PCP 测定的色谱方法进行验证。定量限为 5 ng/mL，测定方法如实验部分所述。所有药物在 5–40 ng/mL 唾液的动态范围内的平均相关系数 > 0.99。校正曲线的平均相关系数 $R^2=0.99644$ (n=6)，平均斜率方程为 $y=0.1531x$ ，其中 x 为 PCP 的浓度；y 为相对响应值，等于药物的峰面积与内标的峰面积的比值。其中一条校正曲线如图 2 所示。

确认方法

监测了 PCP 的两种裂解碎片离子。强度最大的离子 ($m/z=91.2$) 用作定量，两种离子中强度小的 ($m/z=86.2$) 作为定性离子，用作离子比确证。即二者的峰面积之比必须保持恒定，在 $\pm 20\%$ 的限度范围内方可被接受。次要离子对强度所允许的定性离子比为 $59.6\% \sim 89.5\%$ ($0.74 \pm 20\%$)，并且适用于对所有批号样品的分析。以最低校正浓度水平 5 ng/mL 为例，如图 3 所示。

回收率和干扰

测得从 Quantisal™ 装置的收集板得到的 PCP 回收率为 81.67% (SD1.17; n=6)。从无毒受试者采集得到的唾液样品显示对定量测定没有任何干扰，这并不意外，因为这些药物与唾液中的内源性物质不大可能类似。对于外源性的干扰，对通常见到的滥用药物按实验部分所述进

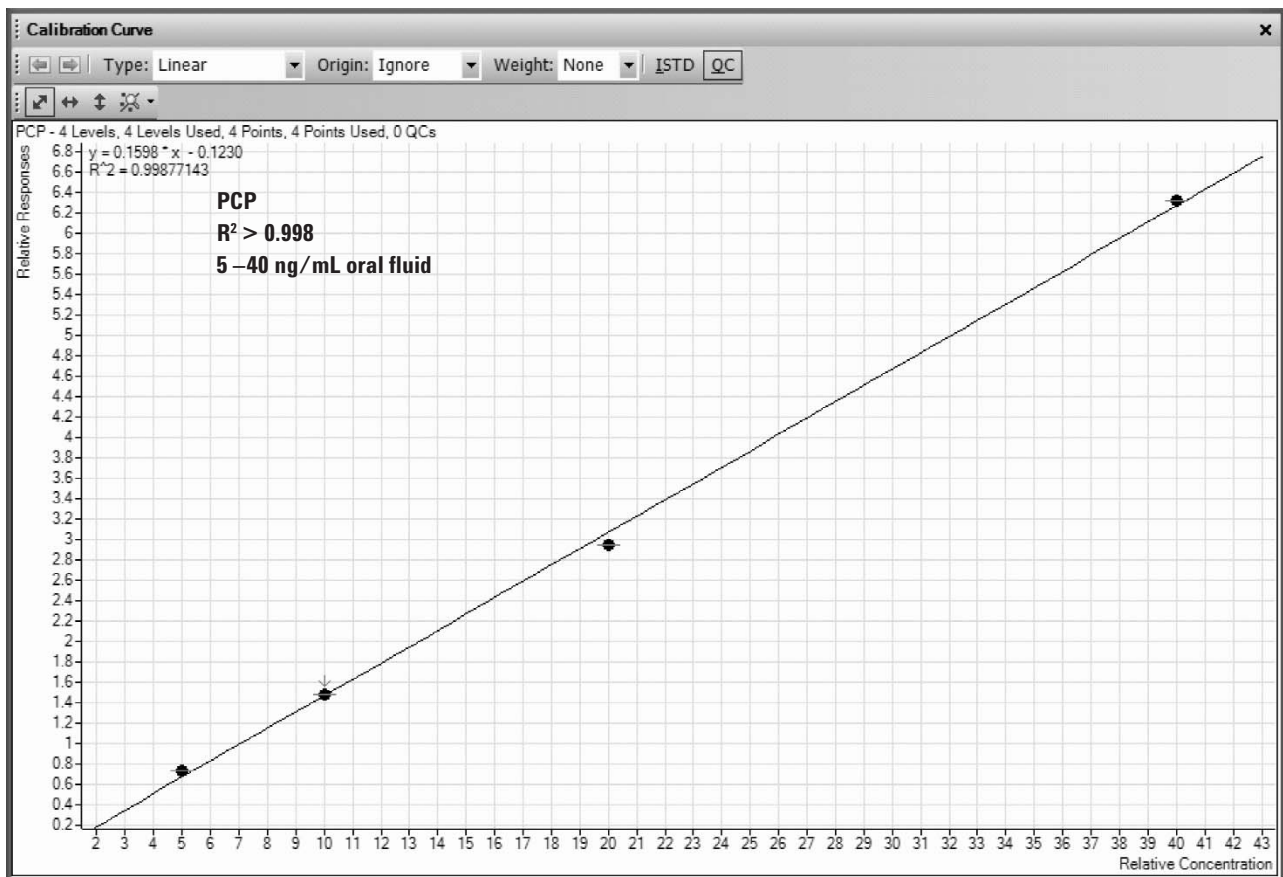


图2. PCP 的线性度

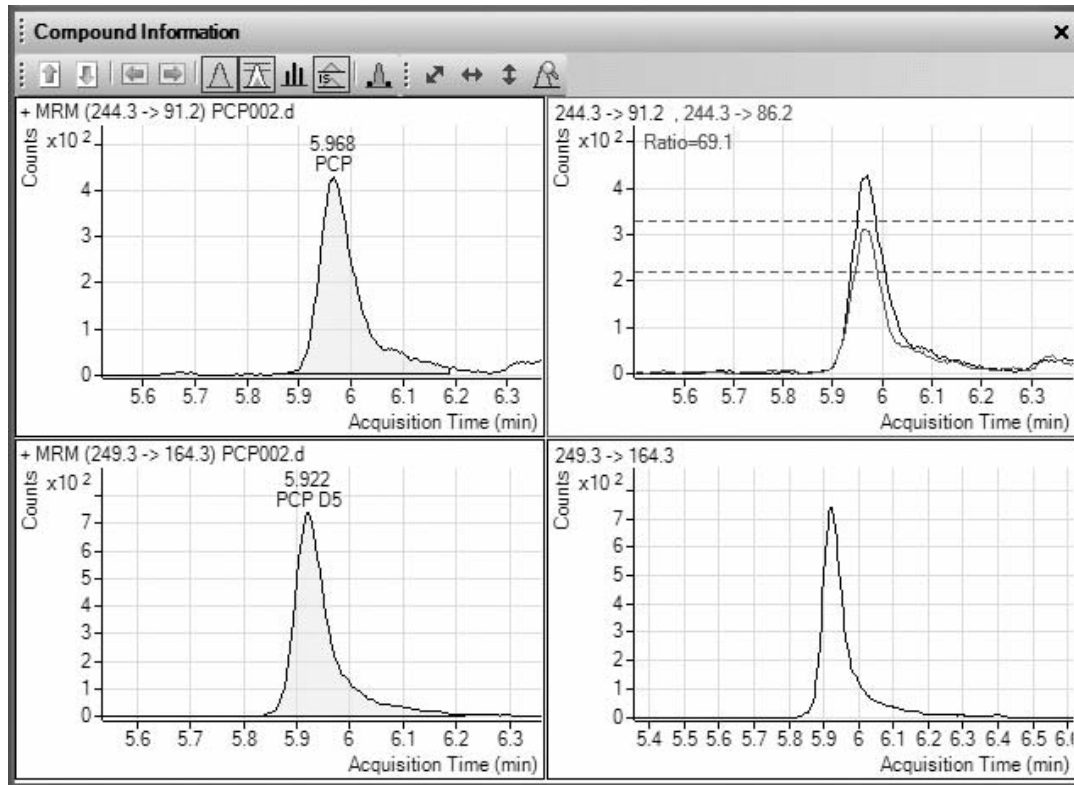


图3. 使用定量/定性离子比值对 PCP 的存在进行确认。在本例中，最低校正浓度水平（5 ng/mL）的离子比值为 0.69，在 0.74 ±20% 范围内

行了研究。在这两种裂解反应的监测中没有发现色谱干扰。由于唾液在收集时已经过稀释，并且使用特殊的固相萃取方法提取药物，因此未发现明显的离子抑制。

精密度、准确度和稳定性

按前述方法对准确度进行了测定，结果如表 2 所示。本方法非常准确，在限值浓度水平得到的偏差最大，为 -6.5%。通过重复测定，得到日间（天与天之间）和日内（同一天）精密度。日间精密度的 3.35% (n=5)；日内精密度为 3.04% (n=5)。最后，对药物在收集系统中的稳定性和提取物的稳定性进行了评估。提取物保存在自动进样器内的仪器架上，温度维持在 4 °C，至少 2 天内是稳定的。48 小时后，提取物定量结果的变化在 5% 以内。

实际样品

本方法已应用于实验室收到的熟练测试样品。结果很出色，所有定量结果与项目管理者确认的小组平均值的偏差均在 10% 之内。一个浓度为 14.7 ng/mL 的实际唾液样品的例子如图 4 所示。

表 2. 六次分析结果的准确度

标称浓度	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL	40 ng/mL
第 1 次分析	4.7	9.5	21	39
2	5.4	9.0	19	40
3	5.3	9.2	19	40
4	5.6	9.2	18	38
5	5	9.8	18	42
6	5	9.4	21	39
平均值 (ng/mL)	5.1	9.3	19.8	40
准确度 (%)	3.3	-6.5	-3.3	-0.83

表 3. 监测浓度为 10 ng/mL 的对照样品的日内和日间重现性

标称浓度	日间 (n = 5)	日内 (n = 5)
	9.5	10
	9.0	10.8
	9.2	10.7
	9.2	10.7
	9.8	10.5
平均值 (ng/mL)	9.34	0.54
标准偏差	0.31	0.32
准确度 (%)	3.35	3.04

结论

本文阐述了对唾液中 PCP 的测定。所用的 LC/MS/MS 方法是可重现的、耐用的、精密的。该分析方法包括了对定性裂解反应的监测和离子比值的计算，为了做出精确的鉴定，要求该比值在已知校正标准品中不超过 $\pm 20\%$ 。该方法易于纳入到实验室的常规检测中。

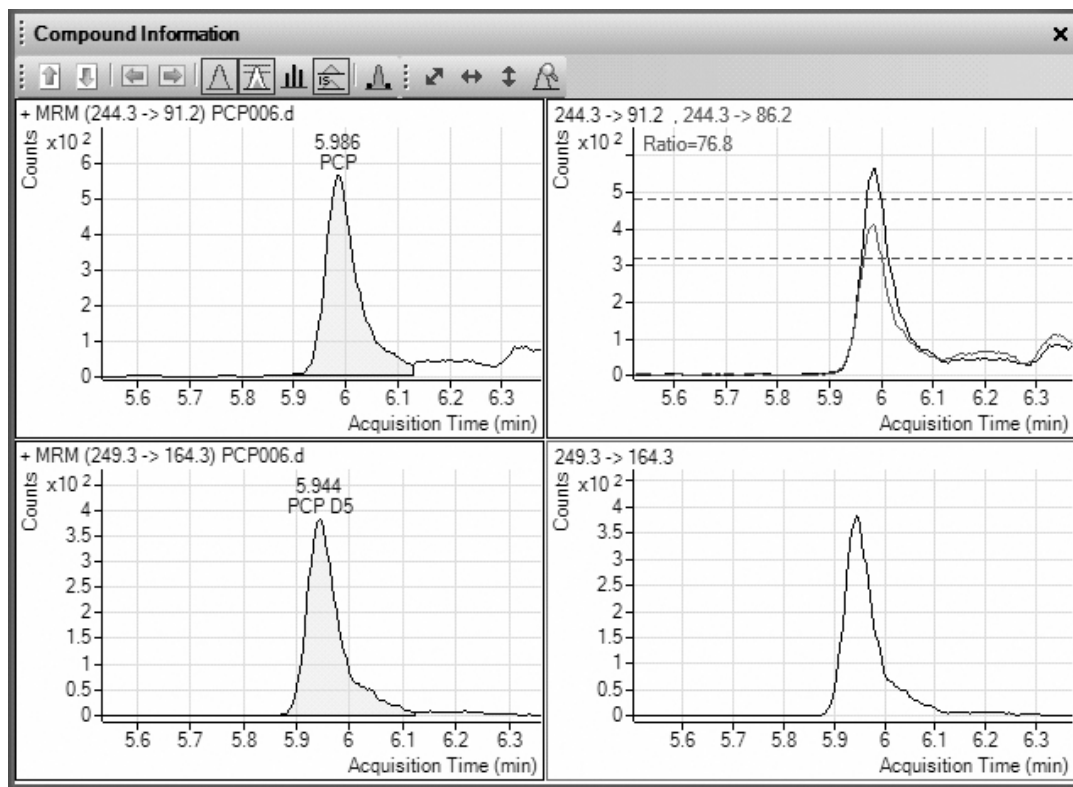


图 4. 使用定量/定性离子比值对浓度为 14.8 ng/mL 的实际病人样品中 PCP 的存在进行确认

参考文献

1. H. P. Hendrickson, E. C. Whaley, S. M. Owens. *J Mass Spectrom* 40(1) (2005) 19
2. G. W. Kunsman, B. Levine, A. Costantino, M. L. Smith. *J Anal Toxicol* 21(6) (1997) 498
3. A. Ishii, H. Seno, K. Watanabe-Suzuki, T. Kumazawa, H. Matsushima, O. Suzuki, Y. Katsumata. *Anal Chem* 72(2) (2000) 404
4. S. Paterson, N. McLachlan-Troup, R. Cordero, M. Dohnal, S. Carman. *J Anal Toxicol* 25(3) (2001) 203
5. C. M. Moore, D. E. Lewis, J. B. Leikin. *J Forens Sci* 41(6) (1996) 1057
6. B. Maralikova, W. Weinmann. *J Chromatogr B* 811 (2004) 21
7. G. F. Kauert, S. Iwersen-Bergmann, S. Toennes, *J Anal Toxicol* 30 (2006) 274
8. P. Kintz, N. Samyn, *Ther Drug Monit* 24 (2002) 239

更多信息

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

安捷伦公司对本材料中可能有的错误或有关装备、性能或使用这一材料而带来的意外伤害和问题不承担任何责任。

本材料中的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司，2008

中国印刷
2008年3月3日
5989-8084CHCN