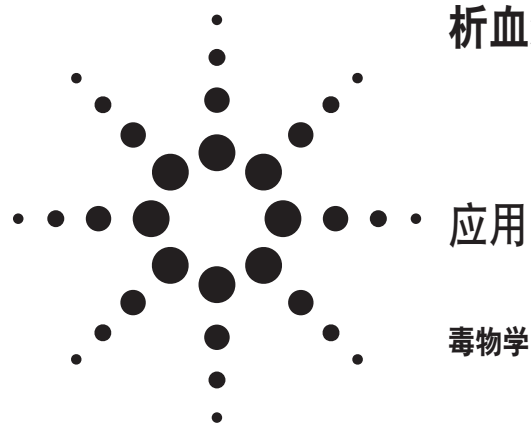


组合离子源-高分离度快速相色谱/串联质谱分析血清中的大麻素和苯丙胺类药物



作者

Jürgen Wendt
Agilent Technologies
Sales and Support GmbH
Waldbronn, Germany

Jörg Röhrich
Institute of Legal Medicine, University Mainz
Mainz, Germany

摘要

液相/质谱/质谱是生物基质样品中大麻素和苯丙胺类药物分析的有效技术。在电喷雾模式下苯丙胺类药物具有很好的离子化效率，而大气压化学电离源更适合大麻素的离子化。使用 1.8 微米粒径色谱柱的液相色谱分离模式，以及安捷伦组合离子源(G1978B)可以实现一次进样分析两类化合物。本方法具有良好的日内和日间分析结果重现性。变异系数在 3% - 15% 之间，其中大多数都在 5% - 10% 之间。

引言

在美国和欧洲，大麻是最常见的滥用药物。而且像苯丙胺化合物的类交感神经药物的滥用程度在过去几年大幅增加。由此导致越来越严重的交通安全问题。针对这个问题，在 1998 年德国道路交通法将对服用大麻素，苯丙胺，以及它们的亚甲基二氧基衍生物，MDMA 及 MDE 之后驾驶的行为进行处罚。自此之后，血液中四氢大麻酚(THC)或苯丙胺的检测量快速增加。因此，各实验室迫切需要能够快速分析大量样品的方法及手段。液相色谱/质谱/质谱是最合适的技术。

苯丙胺是一种碱性化合物，特别是电喷雾离子化的模式，而极性较弱的大麻素则在大气压化学电离源模式下具有较好的灵敏度（见图 1）。为了实现在一次进样就可分析两种化合物，使用安捷伦组合离子源(G1978B)以实现所有的分析目的。组合源可以单独进行电喷雾，大气压化学源或者两种模式同时进行。模式和参数也可以时间编程。



Agilent Technologies

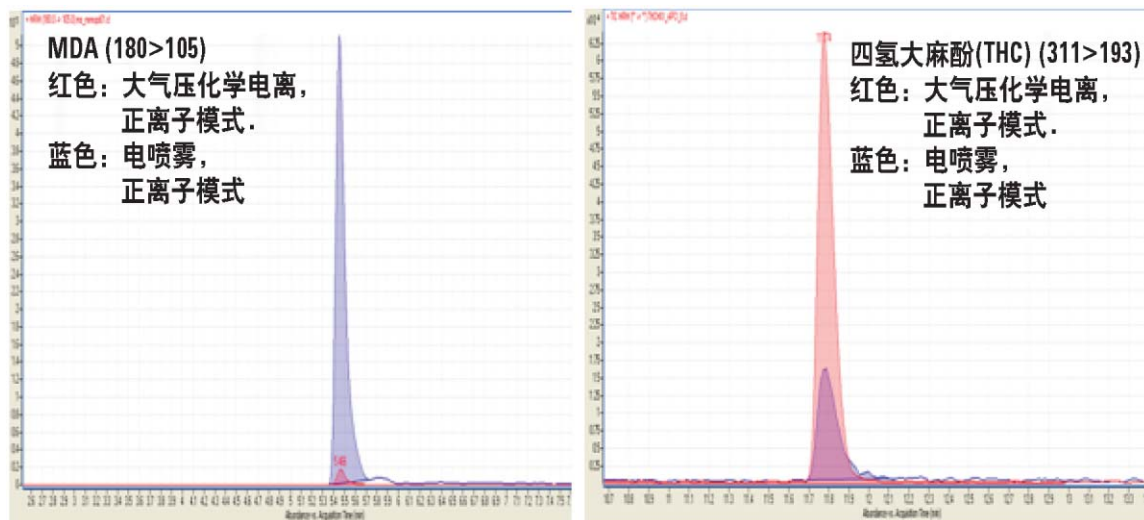


图 1. 在电喷雾和大气压化学电离模式下 MDA 和四氢大麻酚的数据比较

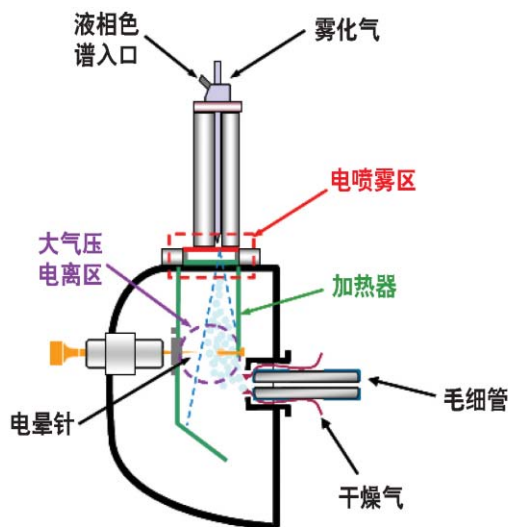


图 2. 组合离子源设计

实验条件

试剂

所有的溶剂和试剂都是分析纯。甲醇，丙酮，醋酸，二氯甲烷，异丙醇和氨水来自默克公司。固相萃取柱采用 Baker 公司，所有的药物标准品和氘代标准品来自 Cerilliant (Austin, TX)。

样品制备

1 毫升的血清，用 6 毫升磷酸缓冲液(0.1 M, pH 6)稀释。加入 50 微升内标混合液（浓度为，每微升含

1ng 的 D₁₁-苯丙胺，D₁₁-脱氧麻黄碱，D₅-MDA，D₅-MDMA，D₆-MDE 和 D₉-THC-COOH 与 D₃-THC 和 D₃-THC-OH) 每种 0.1 ng/μL。溶液混合 3 分钟，然后在 3000 转下离心 10 分钟。固相萃取系统可以采用自动化，如 Caliper Rapid- Trace SPE 工作台，或者手动系统。

上清液加入预先活化的萃取柱(Bakerbond SPE C18, 500 mg),活化步骤是先用 3 毫升甲醇冲洗两次，然后用 2 毫升水冲洗一次备用。样品溶液经过之后，用水淋洗两次，再用 80:20; v/v 的水/甲醇淋洗两次，最后用 0.1M 甲酸溶液淋洗一次。萃取柱干燥 10 分钟。

洗脱分两步。首先用 3 毫升的 50:50; v/v 的二氯甲烷/丙酮将大麻素洗脱出来，然后用 40:10:2; v/v/v 的二氯甲烷/异丙醇/氨水将苯丙胺，阿片，以及可卡因和代谢物洗脱出来。将两个洗脱液合在一起，在 30 °C 下氮气吹干，用 100 微升甲醇再溶。最后用水稀释(1:4),以改善色谱峰形。

液相色谱/质谱/质谱

液质联用系统包括 1200 高分离度快速液相色谱 (RRLC)和 6410 串联四极杆质谱仪。不同的流动相，流速，色谱柱参数来筛选最适合的 ZORBAX 的色谱柱以获得最佳的分离度和最快的分析速度。

经过评价，ZORBAX SB-C18，1.8- μm (2.1 $\times$ 100 mm) 是最佳的色谱柱，流动相为 0.1% 甲酸水溶液/乙腈，梯度洗脱。详细条件参见表 1。

表 1. 液相色谱方法

色谱柱	Zorbax RRHT SB-C18 (2.1 mm id $\times$ 100 mm, 1.8 μm) 部件号 828700-902
柱温	70 $^{\circ}\text{C}$
流动相	A: 含 0.1% 甲酸的水溶液 B: 含 0.1% 甲酸的乙腈
流速	0.6 mL/min
梯度	10% B, 0 min 10% B, 2 min 95% B, 8 min 95% B, 11 min 10% B, 11.5 min
停止时间	15 min
后运行时间	无
进样体积	10 μL (样品最后用水按 1:4 稀释)

除了标准电喷雾和大气压化学电离源之外，还包括安捷伦 G1978B 组合离子源。组合源可以进行电喷

雾和大气压化学电离同时采集，也可以根据时间编程进行电喷雾和大气压化学电离交替采集。

使用 1 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液的流动注射模式进行多反应监测(MRM)的参数优化，结果见表 3。

结果与讨论

对四种可能的采集模式进行了评价，结果见表 3。使用组合源，开始阶段采用电喷雾模式，5 分钟后切换至大气压化学电离模式。由于雾化器的温度从 175 至 250 $^{\circ}\text{C}$ ，液相色谱的流速无法都是最优化的，因此需要一些时间平衡，然后再开始分析大麻素。总分析时间，包括色谱柱平衡时间是 15 分钟。

表 2. 优化的组合模式的质谱参数

组合离子源	雾化气压力 (psi)	干燥气流速 (L/min)	干燥气温度 ($^{\circ}\text{C}$)	放电电压 (V)	毛细管电压 (V)	雾化器温度 ($^{\circ}\text{C}$)	电晕针电流 (μA)
混合	40	5	300	2000	2000	200	2
电喷雾	60	5	300	2000	2000	175	0
大气压化学电离	20	5	300	2000	2000	250	4

表 3. 多反应监测(MRM) 的数据采集参数

化合物	保留时间 (min)	母离子 ($\text{M}-\text{H}^+$)	碰撞电压 (V)	MS/MS			
				碰撞能量 (V)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)	子离子 2 (m/z)
苯丙胺	1.3	136	100	15	91	10	119
氘代-11-苯丙胺	1.3	147	100	15	127	15	97
MDA	1.4	180	100	15	105	15	135
D ₅ -MDA	1.4	185	100	10	168	15	138
甲基苯丙胺	1.5	150	100	15	91	10	119
氘代-11-甲基苯丙胺	1.5	161	100	15	127	15	97
MDMA	1.9	194	100	10	163	15	135
D ₅ -MDMA	1.9	199	100	15	165	10	135
MDE	2.6	208	100	15	135	15	147
D ₆ -MDE	2.6	214	100	15	166	15	136
THC-OH	7.9	331	110	30	193	30	201
D ₃ -THC-OH	7.9	334	110	20	316	25	196
THC-COOH	8.1	345	110	30	193	30	299
D ₉ -THC-COOH	8.1	354	120	22	308	25	196
THC	8.6	315	110	30	193	30	259
D ₃ -THC	8.6	318	100	30	196	30	105

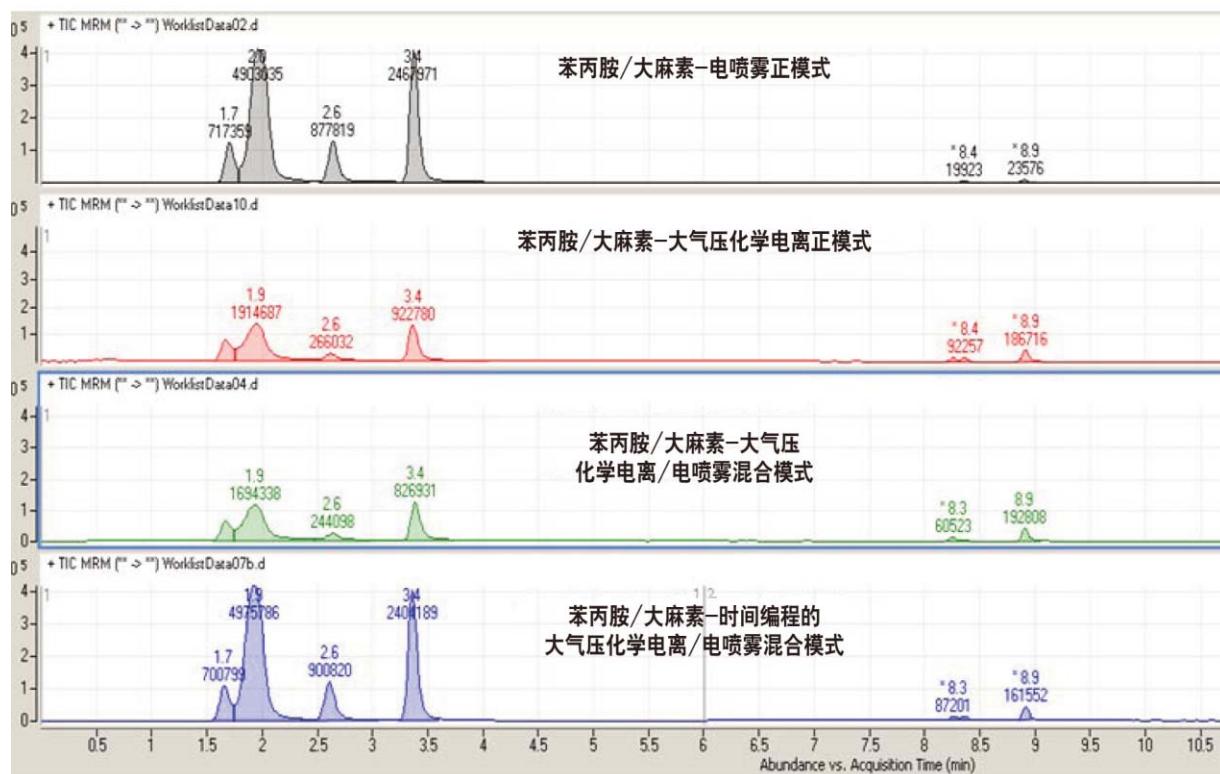


图 3. 四种模式的结果比较

方法认证

液相/质谱/质谱方法验证用血清中 THC, THC-OH, THC-COOH, 苯丙胺, 甲基苯丙胺, MDA, MDMA 和 MDE 的定性和定量来完成。验证程序根据 Peter[1] 和德国毒物及法医化学协会的相关规定和方法进

行。在方法验证中使用基于微软 Excel 的验证程序 (VALSTAT[2])。不含药物的血清作为空白基质用于方法验证。

采用 7 点校正曲线。每个水平都是空白血清加 50 微升含药物的甲醇溶液。校正曲线见表 4。

表 4. 以血清为基质的苯丙胺和大麻素的校正曲线

化学物	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6	Cal 7	Cal 8
苯丙胺	0	10	20	40	60	80	100	500
甲基苯丙胺	0	10	20	40	60	80	100	500
MDA	0	10	20	40	60	80	100	500
MDMA	0	10	20	40	60	80	100	500
MDE	0	10	20	40	60	80	100	500
THC	0	0.5	1	2	3	4	5	25
THC-OH	0	0.5	1	2	3	4	5	25
THC-COOH	0	5	10	20	30	40	50	250

7点校正曲线，其中每个数据点重复六次。校正曲线采用线性模式，对于大多数的化合物其相关系数大于0.99。以第三个校正点的信噪比计算出定量限（峰-峰比）。苯丙胺和大麻素所有的定量离子和定性离子都被准确地测量，即使为了提高峰形而采用1:4的水稀释样品，其具有很好的信噪比（见图4）。

日内测定和日间分析结果精密度是在以下条件进行的：两个浓度水平（低，高浓度）在八天数据的结果计算而得。日内测定的精密度是从一天之内两个浓度水平的样品八次结果的变异系数计算得出。日间测定精密度是从八天测得结果的平均值。日内测定精密度在2.9-15.3%之间（表5）。日间测定精密度在3.4-15.3%之间。

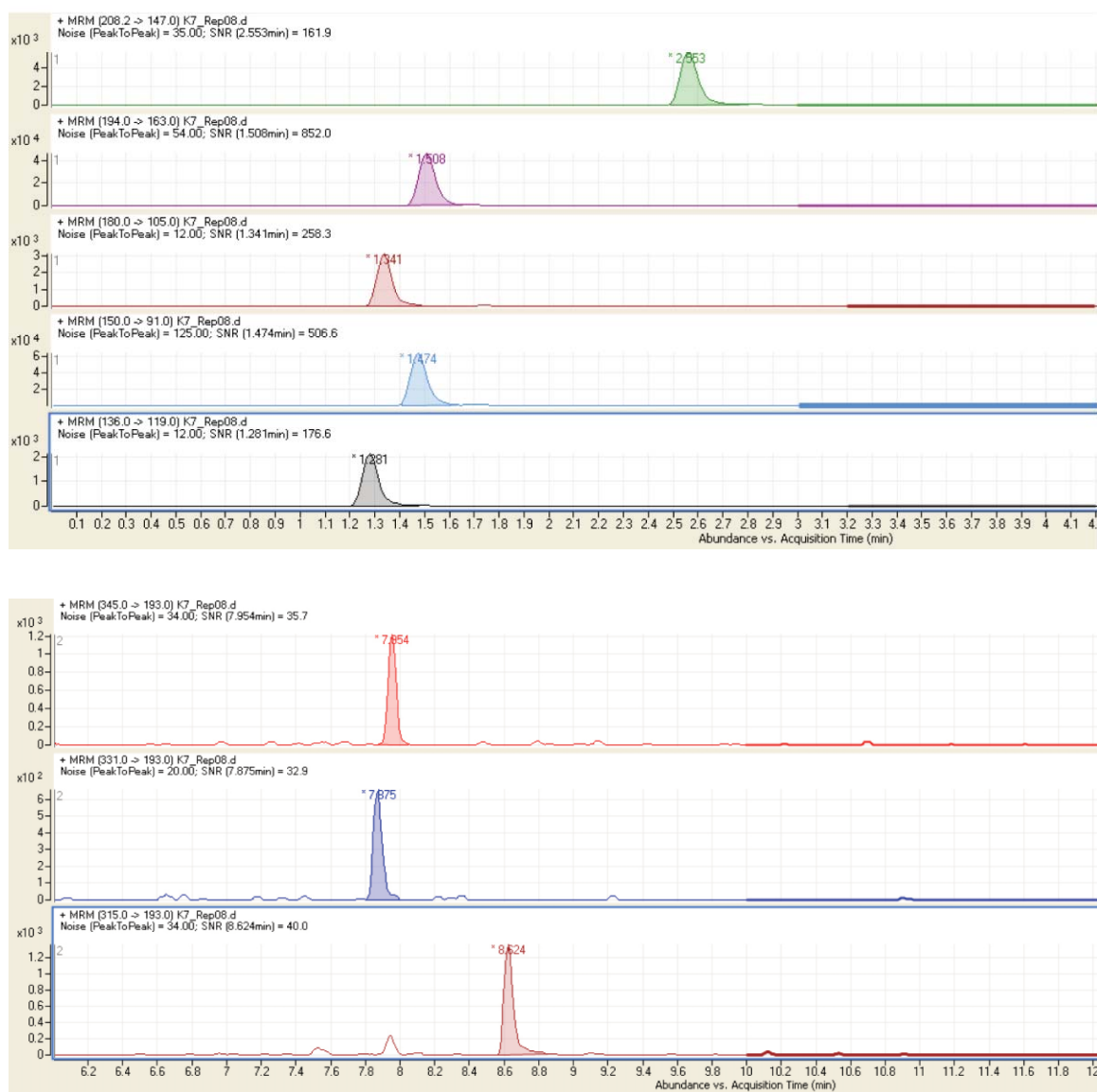


图4. 第三标样点的信噪比

表 5. 两个浓度水平的日内和日间精密度的结果 (第三标样点和第七标样点)

化合物	日内测定精密度, %		日间测定精密度, %	
	校正点 3	校正点 7	校正点 3	校正点 7
苯丙胺	4.3	2.9	4.9	5.6
甲基苯丙胺	4.7	4.7	6.1	5.5
MDA	7.6	4.2	8.4	4.6
MDMA	5.9	3.2	5.9	3.4
MDE	8.5	5.2	8.5	5.6
THC	9.5	5.8	10.0	6.3
THC-OH	8.4	8.7	11.6	8.7
THC-COOH	15.3	5.4	15.3	5.5

结论

使用 1.8 μm 粒径色谱柱的液相分离 (12 分钟), 获得了比气质联用分析更快的分析速度 (45 分钟)。由于两类化合物的极性不同, 因此采用了组合离子源以使每个化合物都获得最佳的相应 (利用时间编程进行采集模式切换)。与现有的气质联用分析方法相比, 高分离度快速液相色谱/串联质谱系统可以获得更高的灵敏度和选择性 (对于气质分析, 进样体积一般是 1 微升, 而液质分析的条件是: 样品在进样前稀释 4 倍, 进样体积是 10 微升)。日间和日内测定精密度也很好, 变异系数在 3-15% 之间, 而且大多数的化合物的精密度在 5-10% 之间。

其它的滥用药物 (阿片类, 如吗啡, 6-乙酰吗啡, 可待因以及可卡因及代谢物) 也将被包括在此液相色谱/质谱/质谱方法里。其中在线固相萃取也将被评价。

参考文献

1. F. T. Peters and H. H. Maurer, "Bioanalytical Method Validation and Its Implications for Forensic and Clinical Toxicology – A review," *Accred. Qual. Assur.* 7, 441–449 (2002)
2. G. Schmitt, M. Herbold, and F. Peters, "Methodenvalidierung Im Forensisch-Toxikologischen Labor," Arvecon Walldorf (2003)

致谢

作者感谢 John Hughes 博士 (安捷伦科技有限公司) 审阅了文章并且提供了有益的建议。

更多的信息

有关更多的关于产品和服务信息, 请浏览 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦不须承担由于与家具, 性能或使用这种材料而造成的偶然或必然的损害或者错误。

信息, 描述和指标可能, 不另行通知

© 安捷伦科技公司, 2008

中国印刷
2008 年 6 月 10 日
5989-8368CHCN



Agilent Technologies