30 多份应用

安捷伦样品前处理、液相色谱柱、气相色谱柱和备件应用文集

解决当下法医毒理学难题的可靠方法

The Measure of Confidence

Agilent Technologies

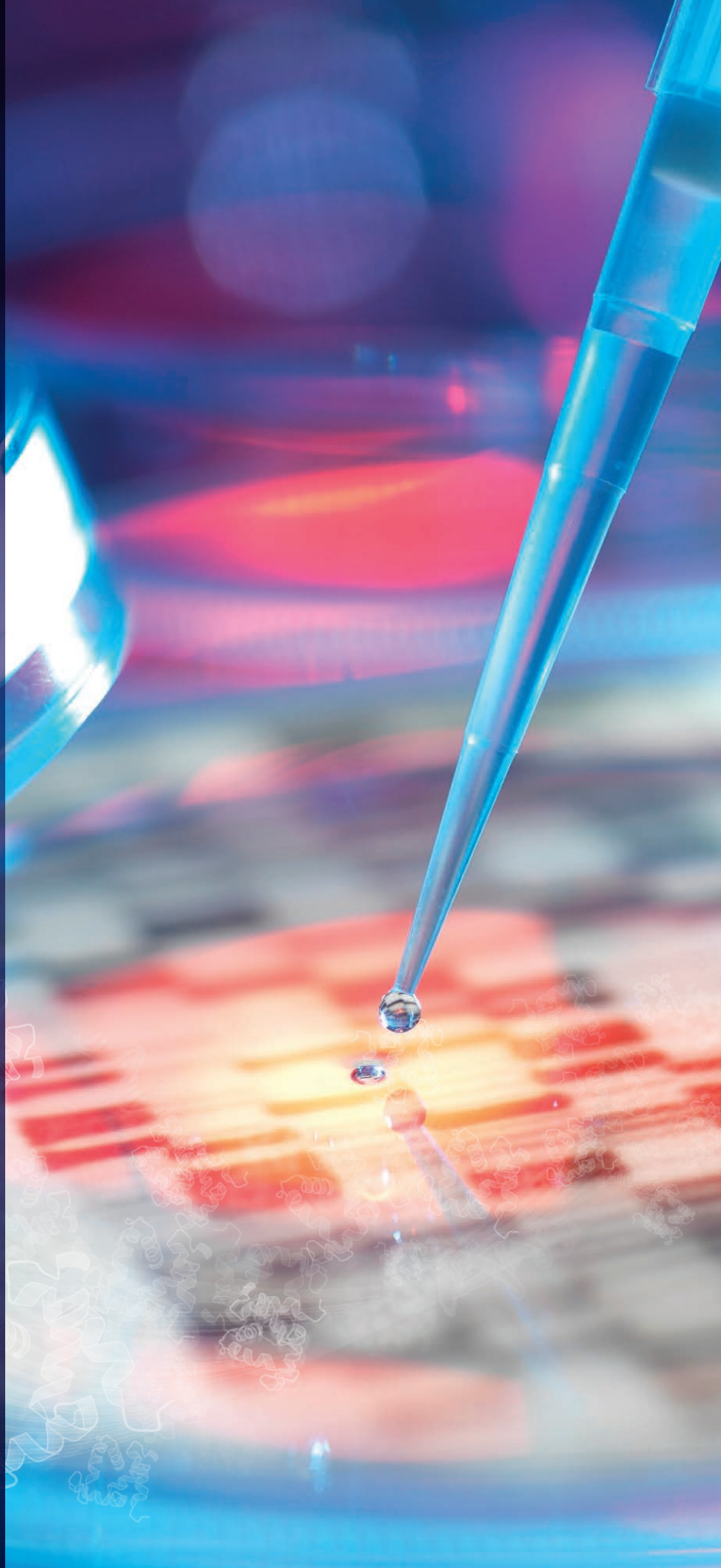
前言

快速获得结果，确保数据可靠

无论是毒品检测、工作场所的药物筛查、死后样品检验，还是血液中酒精浓度的确认，真相和专业性都依赖于结果的可靠性。安捷伦可靠的仪器和备件可用于成千上万种物质的鉴定、确证和定量，在行业中处于领先地位。

在本互动文集中您将了解到现有与新兴的应用，这些应用可帮助您保持最佳实践方式，工作流程运行更为顺畅，并能满足严格的监管链方案。

了解有关执行快速、
可靠的法医毒理学分析的
更多信息：
agilent.com/chem/forensics



目录

刑侦学

请单击标题进行查看：

应用简报标题	出版号	页码
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的 6-乙酰吗啡进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9622CHCN	8
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的安非他明类进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9623CHCN	14
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯甲酰爱康宁进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9624CHCN	24
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的鸦片类药物（吗啡和可待因）进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9625CHCN	30
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯环己哌啶进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9626CHCN	38
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的 11-nor-9-羧基-Δ^9-四氢大麻酚进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9627CHCN	44
唾液中的合成大麻素	5990-9679CHCN	50
采用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 和 Agilent Poroshell 120 色谱柱对全血中的丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡进行 LC/MS/MS 分析	5990-9930CHCN	58
快速、稳定而灵敏地检测头发中的 11-nor-Δ^9-四氢大麻酚-9-羧酸	5990-7535CHCN	64
快速可靠地检测血液中的 THC 及其代谢物	5990-8456CHCN	72

以下列出支持刑侦学应用的安捷伦样品前处理、色谱柱和备件。单击产品名获取详细信息。

- **气相色谱柱：**
  - DB-1ms UI
  - DB-5ms UI
  - DB-35ms UI
  - DB-624 UI
  - DB-FFAP
  - HP-Blood alcohol
- **安捷伦惰性流路解决方案：**
  - 超高惰性衬管
  - 惰性进样口焊件
  - 超高惰性分流平板
  - 惰性质谱离子源
  - 微板流路技术吹扫两通接头
  - UltiMetal Plus 可塑金属密封垫圈
  - Gas Clean 气体净化器
- **液相色谱柱：**
  - Poroshell 120
  - ZORBAX RRHD
  - ZORBAX RRHT
  - ZORBAX Eclipse Plus
- **液相色谱保护柱：**
  - UHPLC 快速保护柱
- **样品前处理：**
  - Bond Elut Certify (SPE)
  - Bond Elut Plexa 系列 (SPE)
  - Chem Elut (SLE)
- **过滤：**
  - Captiva 过滤芯
- **液相色谱备件：**
  - 1290 液相色谱仪
  - 1220 液相色谱仪

了解有关执行快速、可靠的法医毒理学分析的更多信息：**agilent.com/chem/forensics**

唾液

请单击标题进行查看：

应用简报标题	出版号	页码
唾液中的合成大麻素	5990-9679CHCN	83

以下列出支持唾液应用的安捷伦样品前处理、色谱柱和备件。单击产品名获取详细信息。

- **气相色谱柱：**
  - DB-1ms
  - DB-17ms
- **安捷伦惰性流路解决方案：**
  - 超高惰性衬管
  - 惰性进样口焊件
  - 超高惰性分流平板
  - 惰性质谱离子源
  - 微板流路技术吹扫两通接头
  - UltiMetal Plus 可塑金属密封垫圈
  - Gas Clean 气体净化器
- **液相色谱柱：**
  - Poroshell 120
  - ZORBAX RRHD
  - ZORBAX RRHT
  - ZORBAX Eclipse Plus
- **液相色谱保护柱：**
  - UHPLC 快速保护柱
- **样品前处理：**
  - Bond Elut Plexa (SPE)
  - Bond Elut Plexa PCX (SPE)
  - Bond Elut Certify
- **样品过滤：**
  - Captiva 过滤芯
- **液相色谱备件：**
  - 1290 液相色谱仪
  - 1220 液相色谱仪

化学合成毒品

请单击标题进行查看：

应用简报标题	出版号	页码
唾液中的合成大麻素	5990-9679CHCN	92

以下列出支持化学合成毒品应用的安捷伦样品前处理、色谱柱和备件。单击产品名获取详细信息。

- **气相色谱柱：**
  - HP-5ms UI
- **安捷伦惰性流路解决方案：**
  - 超高惰性衬管
  - 惰性进样口焊件
  - 超高惰性分流平板
  - 惰性质谱离子源
  - 微板流路技术吹扫两通接头
  - UltiMetal Plus 可塑金属密封垫圈
  - Gas Clean 气体净化器
- **液相色谱柱：**
  - Poroshell 120
  - ZORBAX RRHD
  - ZORBAX RRHT
  - ZORBAX Eclipse Plus
- **液相色谱保护柱：**
  - UHPLC 快速保护柱
- **样品前处理：**
  - Bond Elut Certify (SPE)
  - Bond Elut Plexa 系列 (SPE)
  - Chem Elut (SLE)
- **过滤：**
  - Captiva 过滤芯
- **液相色谱备件：**
  - 1290 液相色谱仪
  - 1220 液相色谱仪

了解有关执行快速、可靠的法医毒理学分析的更多信息：**agilent.com/chem/forensics**

药物筛查和确认

请单击标题进行查看：

应用简报标题	出版号	页码
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的 6-乙酰吗啡进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9622CHCN	101
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的安非他明类进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9623CHCN	107
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯甲酰爱康宁进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9624CHCN	117
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的鸦片类药物（吗啡和可待因）进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9625CHCN	123
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯环己哌啶进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9626CHCN	131
应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的 11-nor-9-羧基-Δ^9-四氢大麻酚进行符合 SAMHSA 规定的 LC/MS/MS 分析	5990-9627CHCN	137
唾液中的合成大麻素	5990-9679CHCN	143
采用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 和 Agilent Poroshell 120 色谱柱对全血中的丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡进行 LC/MS/MS 分析	5990-9930CHCN	151
快速、稳定而灵敏地检测头发中的 11-nor-Δ^9-四氢大麻酚-9-羧酸	5990-7535CHCN	157
快速可靠地检测血液中的 THC 及其代谢物	5990-8456CHCN	165
使用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 通过聚合物 SPE 阳离子交换萃取尿液中的苯二氮卓类药物	SI-01334	175
使用 Bond Elut Plexa 聚合物固相萃取剂萃取血浆中的碱性药物	5990-7685CHCN	179
使用 Bond Elut Plexa PCX 聚合物阳离子交换固相萃取柱萃取血浆中的极性碱性药物	SI-01015	183
使用 Bond Elut Plexa 聚合物阳离子交换固相萃取柱萃取血浆中的非极性碱性药物	SI-01014	186
固相萃取全血中的 THC、THC-COOH 和 11-OH-THC	A02465	189
采用改良的微量 QuEChERS 方法进行样品前处理并通过 Poroshell 120 分析全血中的药物	5990-8789CHCN	193
使用 SPE 混合型强阴离子交换聚合物树脂 (Agilent SampliQ-SAX) 对尿液中的酸性、碱性和中性药物进行分级分离	5990-4965CHCN	203
使用 SPE 混合型强阳离子交换聚合物树脂 (Agilent SampliQ-SCX) 对血浆中的酸性、碱性和中性药物进行分级分离	5990-5001CHCN	211

（下接第 6 页）

了解有关执行快速、可靠的法医毒理学分析的更多信息：**agilent.com/chem/forensics**

药物筛查和确认 *(续)*

以下列出支持刑侦学应用的安捷伦样品前处理、色谱柱和备件。单击产品名获取详细信息。

- **气相色谱柱：**
  - DB-1ms UI
  - DB-5ms UI
  - DB-35ms UI
  - DB-624 UI
  - DB-FFAP
- **安捷伦惰性流路解决方案**
  - 超高惰性衬管
  - 惰性进样口焊件
  - 超高惰性分流平板
  - 惰性质谱离子源
  - 微板流路技术吹扫两通接头
  - UltiMetal Plus 可塑金属密封垫圈
  - Gas Clean 气体净化器
- **液相色谱柱：**
  - Poroshell 120
  - ZORBAX RRHD
  - ZORBAX RRHT
  - ZORBAX Eclipse Plus
- **液相色谱保护柱：**
  - UHPLC 快速保护柱
- **样品前处理：**
  - Bond Elut Certify (SPE)
  - Bond Elut Plexa 系列 (SPE)
  - Chem Elut (SLE)
- **过滤：**
  - Captiva 过滤芯
- **液相色谱备件：**
  - 1290 液相色谱仪
  - 1220 液相色谱仪

了解有关执行快速、可靠的法医毒理学分析的更多信息：**agilent.com/chem/forensics**

刑侦学

在刑事调查中应用先进技术

有效的检测、测量和分析在犯罪预防、刑事侦查和执法方面具有重要作用。随着犯罪性质和证据使用的复杂化，犯罪侦查学将发挥越来越大的作用。

安捷伦的前沿检测和分析仪器产品组合涵盖了犯罪侦查学标准过程的所有环节，其中包括气相色谱仪、液相色谱仪、样品前处理产品、色谱柱和备件。

了解有关物证
检测的更多信息：
agilent.com/chem/forensics

返回目录

应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的 6-乙酰吗啡进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用和精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月起生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室使用 LC/MS/MS 法对初步药物检测结果进行确认。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生步骤，因此比先前使用的 GC/MS 法简便得多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的 6-乙酰吗啡的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六种简便检测方法之一，该方法主要使用安捷伦产品进行分析，包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂、Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.7 µm 表面多孔 LC 色谱柱、Agilent 1200 Infinity LC 系统以及应用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

6-乙酰吗啡或 6-单乙酰吗啡（6-AM）是海洛因特有的一种代谢物。海洛因（或二乙酰吗啡）是一种由吗啡合成的成瘾性鸦片类药物。海洛因在体内通过脱乙酰化作用迅速代谢生成 6-AM，然后再缓慢地代谢为吗啡。6-乙酰吗啡被认为是服用海洛因后，导致所有急性反应的主要成分。6-AM 可在摄入海洛因 24h 内的尿液中检出。在室温下储存的尿样中，6-AM 可以在 7 天内几乎完全水解为吗啡。在冷冻贮藏的尿液中，6-AM 被认为是相对稳定的。SAMHSA 最新规定 6-AM 的最高限量浓度为 10 ng/mL，其 10% 为检测限，即 1ng/mL。

由于 Agilent Bond Elut Plexa 独特的性质，本文所描述的简便提取方法实现了 6-AM 可重现的高回收率的提取。与其它聚合物吸附剂不同，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了与蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重现性的实现，主要得益于色谱柱填料的窄粒径分布，并且不含容易导致堵塞的细颗粒。

选用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱是由于其具有高容量和良好的分离性能。与亚 2 µm UHPLC 色谱柱相比，填充了表面多孔 2.7 µm 填料的 Poroshell 120 色谱柱可提供与其相似的柱效，但其系统背压却可降低约 40%。因此它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规 LC 系统上采用更高的流速来提高分辨率，并同时缩短分析时间和再平衡时间。

本方法在较小的样品进样体积（10 µL）和无预富集的条件下，具有极高的信噪比（样品浓度 1 ng/mL 时> 190:1，该浓度为 SAMHSA 规定限量浓度的 10%）。这得益于应用了 AJST 技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发，2010）使用的是 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品和操作步骤。

实验部分

分析物

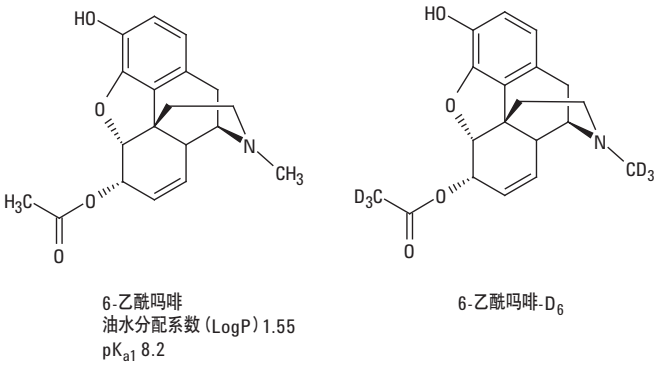


图 1. 6-乙酰吗啡分析物及其结构

药物标准品购自 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（6-乙酰吗啡）和 100 µg/mL（6-乙酰吗啡- D_6）的乙腈溶液。

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg，3 mL（部件号：12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号：12234100）
- Agilent 截止阀（部件号：12234520）
- Agilent 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号：5182-0716）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号：5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱（部件号：699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机，低延迟体积配置的 1312B 二元泵，G1367E 自动进样器，G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用安捷伦 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

预处理

往 1 mL 尿液中加入内标，使其浓度为 20 ng/mL，推荐使用 12×75 mm 玻璃试管。加入 2%甲酸 1 mL，涡旋，若溶液浑浊则离心。

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后让其自然滴出
2. 上样/加载上清液
3. 淋洗 1：1 mL 2% 甲酸溶液
4. 淋洗 2：1 mL 甲醇
5. 在真空（10–15 英寸汞柱）条件下，抽干 5-10 分钟
6. 用 1 mL 新鲜配制的甲醇：氢氧化铵（100:10）溶液洗脱，先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后用低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
7. 氮气吹干
8. 用 1 mL 初始流动相（10%甲醇、90%水、0.1%甲酸）复溶。

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1% 甲酸水溶液	
流动相 B	0.1% 甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	10
	1.5	25
	2.0	60
	2.1	90
	5.0	90
	5.1	10
停止时间	5.2 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	10 µL	
进样并洗针		
洗针	用 75: 25 甲醇：水冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数	
离子检测模式	正离子
毛细管电压	2, 800 V
干燥气流速	13 L/min
干燥气温度	350 ˚C
雾化气压力	35 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	400 ˚C
喷嘴电压	0 V
MS 参数	
扫描模式	MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.2 min-切换阀到 MS
Delta EMV (+)	400 V

结果与讨论

在酸性 pH 条件下，6-乙酰吗啡的叔胺基团质子化，从而分析物可以通过疏水保留和强阳离子交换作用被高效的保留在 Plexa PCX 聚合物吸附剂上。

100%甲醇冲洗 SPE 小柱，可去除大部分基质干扰而无 6-AM 的流失。为破坏分析物和强阳离子交换吸附剂之间的离子相互作用，将一种强碱加入到有机洗脱液中。在样品洗脱前，将 10% NH_4OH 溶液加入甲醇中，以提高 6-AM 的回收率。

Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱可实现尿液提取物中 6-AM 的快速分离，并可获得良好的峰形（如图 2 所示）。液相分离开始时采用低有机溶剂比例（10%）的流动相，从而在样品运行开始时使尿液中的盐类和其它极性成分先洗脱下来。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液（0 到 1.2 分钟），以尽量减少离子源污染。在第 1.2 分钟切换阀将液流转至质谱检测器后立即开始数据采集。0.8 mL/min 的流速可实现较短的保留时间和再平衡时间。

SAMHSA 准则要求分析目标化合物和内标物时必须使用一个定量离子和至少一个定性离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1）信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
6-AM	328.2	165.1	140	40
6-AM	328.2	211.1	140	25
6-AM	328.2	193.1	140	25
6-AM-D_6	334.2	165.1	140	40
6-AM-D_6	334.2	211.1	140	25

本方法采用 MRM 扫描模式，设置为常态而非动态检测，因为动态 MRM 模式对单一化合物的检测没有优势。

1 ng/mL 时色谱峰信噪比超过 190:1（如图 2，上图所示），显示了 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统优异的性能，能够非常可靠地检测远低于 SAMHSA 限量浓度的 6-AM（10%）。

图 3 给出了 5 个浓度水平的尿液提取标准品 6-乙酰吗啡的校准曲线。向不含有 6-乙酰吗啡的尿液中加入 6-乙酰吗啡标准品，配制成浓度分别为 1.0、10、50、200 和 400 ng/mL 的校准标准溶液。添加氘代内标 6-AM-D6 的浓度为 20 ng/mL。线性关系极为优异，$R^2 > 0.999$，表明该方法在一个较宽的动态浓度范围内呈线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的 6-AM 预加到阴性尿液中，然后进行萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用同样方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入 6-AM 标准品到 10 ng/mL，平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（即复溶溶剂），使其浓度为 10 ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

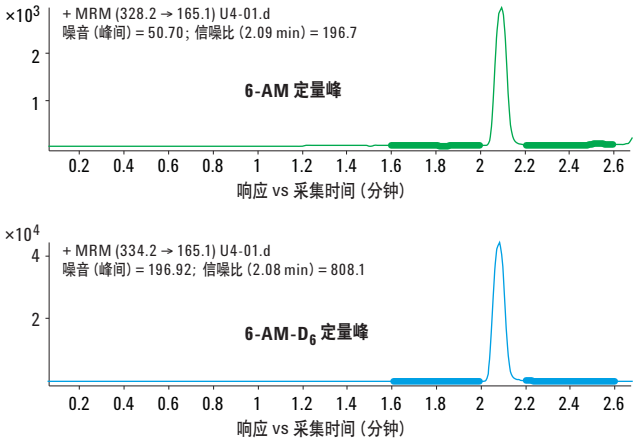


图 2. 尿液提取物中 6-AM（1 ng/mL）和 6-AM-D6 （20 ng/mL）的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱。噪声区域以加粗的形式显示

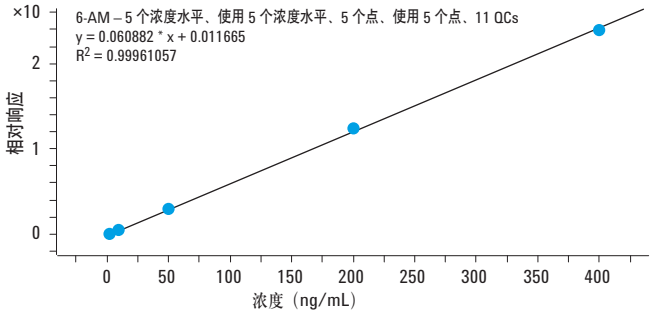


图 3. 尿液提取物中 6-AM 的校准曲线示例。校准范围为 1.0 到 400 ng/mL。线性相关系数 $R^2 > 0.999$

表 2. 6-乙酰吗啡分析方法评价，n = 5

	%
处理效率 *	83
萃取回收率 *	83
基质效应 *	100
准确度 **	106
精密度 (CV)**	0.6

* 限量浓度条件下测定　** 限量浓度的 40%条件下测定

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的提取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得的。

表 2 显示了 6-乙酰吗啡较高的提取回收率（83%）和良好的准确度（106%）以及精密度（0.6%）。100%的基质效应表明无基质干扰导致的信号增强或抑制，因此可确定经 Plexa 处理的提取物非常纯净。

结论

这里描述的固相萃取样品制备和 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全遵循 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高精密度、准确度和重现性的有法律效力的数据结果。其硬件配置与 2011 版 SAMHSA 方法中的相同均来自安捷伦。这些方法特别为所有安捷伦 1100 和安捷伦 1200 LC 系列的用户开发，这些 LC 系统的背压均不超过 400 bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，离子源参数可以很容易地修改。安捷伦科技可提供电子版本的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

参考文献

1. Anon (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/
2. R. Baselt (2008) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man.* 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. J. Hughes and P. Moorman (2011) “Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing”. Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem/cn.
4. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng (2003) “Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS”. *Analytical Chemistry*, 75: 3019-3030.
5. P. Moorman and J. Hughes (2010) “6-Acetylmorphine in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS)”. SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5857EN.
6. E. Rook, A. Huitema, W. van den Brink, J. van Ree, and J. Beijnen (2006) “Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature”. *Current Clinical Pharmacology*, 1: 109-118.
7. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.
8. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller (2009) “A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples for morphine, codeine, 6-acetylmorphine, and benzoylecgonine”. *Journal of Analytical Toxicology,* 33: 398-408.

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

©安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 10 日，中国印刷
5990-9622CHCN

Agilent Technologies

应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯丙胺类药物进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用与精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室采用 LC/MS/MS 法确认初步药物测试结果。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生步骤，因此它远比以前应用的 GC/MS 法要简便的多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的 5 种苯丙胺类药物的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六种简便检测方法之一，该方法主要使用安捷伦产品进行分析，包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂，Agilent Poroshell 120 EC-C18，2.7µm 表面多孔 LC 色谱柱，Agilent 1200 Infinity LC 系统以及应用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

苯丙胺类药物属于拟交感神经胺类化合物，是很强的神经兴奋剂，其功效和作用类似于内源性神经递质，如肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺。苯丙胺类成分是在草麻黄叶子中发现的（例如麻黄碱），并且于 19 世纪末第一次被合成出来。它们化学结构的特征是具有一个苯乙胺骨架，α碳上连着一个甲基，还有其它的一些取代基团（如图 1 所示）。很大一部分苯丙胺类化合物以原型药物形式从尿液中排出。通过去甲基化作用，较复杂的苯丙胺类衍生物被代谢为较简单的结构，例如甲基苯丙胺代谢为苯丙胺，MDMA 代谢为 MDA。除了苯丙胺类药物，还有许多其它种类的药物会在人体内代谢成甲基苯丙胺和苯丙胺类物质，这就是所谓的苯丙胺类生成药物或苯丙胺前体化合物，例如安非他尼、氯苄苯丙胺、芬乙茶碱和丙炔苯丙胺等。2011 版的 SAMHSA 准则要求对 5 种苯丙胺类药物进行筛选并确认，分别是苯丙胺、甲基苯丙胺、MDA、MDMA 和 MDEA。所用分析方法应具备使这些药物与其结构类似物相区分的能力，以确保避免潜在的干扰，这些干扰物包括麻黄碱、伪麻黄碱、芬特明和苯丙醇胺（即 PPA 或去甲麻黄碱）等。

在检测苯丙胺类药物的传统 GC/MS 法中，通常用高碘酸预处理来氧化羟基苯乙胺类成分如麻黄碱和伪麻黄碱，以排除此类化合物的干扰。我们取消了这一步骤，而是依据最新 SAMHSA 准则中所要求的对所有目标分析物实现了可靠的色谱分离。

新的 SAMHSA 准则规定苯丙胺类药物的最高限量浓度为 250 ng/mL，检测限为限量浓度的 10%，即 25 ng/mL。由于预计在一些尿样中可能出现高浓度苯丙胺类药物（如同阿片类药物），我们选择使用更高容量的 3 mm id Agilent Poroshell 120 色谱柱代替所有以前安捷伦 SAMHSA 方法中的 2 mm id 色谱柱。与亚 2 µm 的 UHPLC 色谱柱相比，填充了 2.7 µm 表面多孔颗粒的 Poroshell 120 色谱柱具有与其类似的柱效，但其背压却减少了 40%左右。因此，它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规液相色谱系统上通过使用更高的流速来提高分辨率，同时缩短分析时间和再平衡时间。

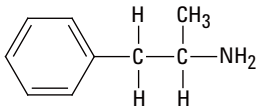
由于 Agilent Bond Elut Plexa 的独特性质，本文所描述的提取方法获得了苯丙胺类药物极高的回收率，且重复性好。不像其它聚合物吸附剂，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重复性的实现，主要得益于色谱柱填料的窄粒径分布，并且不含易引起堵塞的细颗粒。

在较小的样品进样体积（2 µL）和无预富集的条件下，该方法获得了极好的信噪比（样品浓度 25ng/mL 时>400:1，该浓度只有 SAMHSA 规定限量浓度的 10%），这得益于应用了 AJST 技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

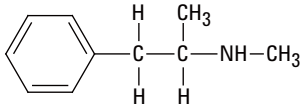
安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发，2010）采用的是 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品和操作步骤。

实验部分

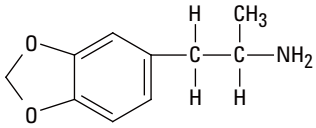
分析物



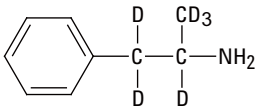
苯丙胺
Log P 1.79 pKa 9.8



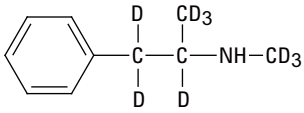
甲基苯丙胺
Log P 1.94 pKa 9.5



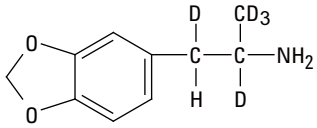
MDA
Log P 1.67 pKa 9.7



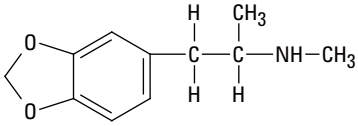
苯丙胺-D_6



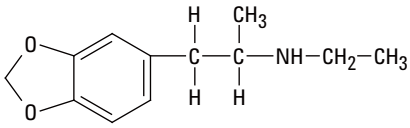
甲基苯丙胺-D_9



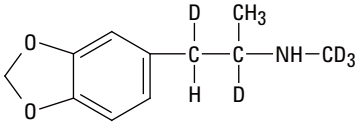
MDA-D_5



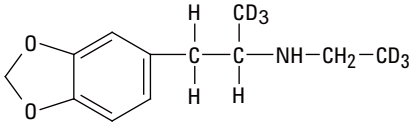
MDMA
Log P 2.05 pKa 9.9



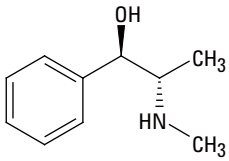
MDEA
Log P 2.34 pKa 9.9



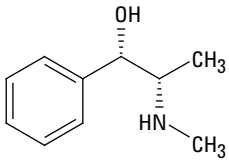
MDMA-D_5



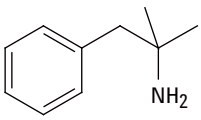
MDEA-D_6



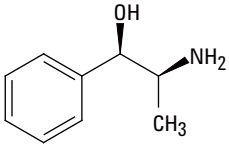
麻黄碱
Log P 1.13 pKa 9.6



伪麻黄碱
Log P 0.89/1.1 pKa 9.9



芬特明
Log P 2.16 pKa 10.1



苯乙醇胺
Log P 0.81 pKa 9.4

图 1. 苯丙胺类药物与其干扰物及这些分析物的结构

药物标准品购自 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（苯丙胺、甲基苯丙胺、MDA、MDMA、MDEA、麻黄碱、伪麻黄碱、芬特明和苯丙醇胺）和 100 µg/mL（苯丙胺-D_6、甲基苯丙胺-D_9、MDA-D_5、MDMA-D_5 和 MDEA-D_6）的甲醇溶液。

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg, 3 mL（部件号 12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号 12234100）
- Agilent 截止阀（部件号 12234520）
- Agilent 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号 5182-0716）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号 5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱(部件号 699975-302)
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机，低延迟体积配置的 1312B 二元泵，G1367E 自动进样器，G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用安捷伦 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

预处理

往 0.5 mL 尿液中加入各内标物，使浓度均为 500 ng/mL，推荐使用 12 × 75 mm 玻璃试管。加入 1 mL 2%甲酸溶液，涡旋，若溶液浑浊则离心。

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后使其自然滴出
2. 上样/加载上清液
3. 淋洗 1: 1 mL 2%甲酸溶液
4. 淋洗 2: 1 mL 甲醇
5. 在真空（10–15 英寸汞柱）条件下，抽干 5-10 分钟
6. 用 1 mL 新鲜配制的乙酸乙酯：甲醇：氢氧化铵（50:50:20）溶液洗脱。先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后用低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
7. 在低于 37 °C 条件下用氮气将洗脱液吹干至 0.2 mL
8. 在洗脱液中加入 100 µL 0.025 M 盐酸溶液，涡旋
9. 蒸干
10. 用 0.5 mL 初始流动相（15%甲醇，85%水和 0.1%甲酸）复溶 。

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1%甲酸水溶液	
流动相 B	0.1%甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	15
	1.5	15
	3.5	30
	3.6	90
	6.6	90
	6.7	15
停止时间	6.8 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	2 µL	
进样并洗针		
洗针	用 75: 25 甲醇: 水冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数	
离子检测模式	正离子
毛细管电压	4,000 V
干燥气流速	10 L/min
干燥气温度	350 °C
雾化气压力	35 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	400 °C
喷嘴电压	0 V
MS 参数	
扫描类型	MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 0.6 min （干扰物分离）或 1.2 min（仅 5 种苯丙胺类药物） –切换阀到 MS
Delta EMV (+)	200 V

结果与讨论

在酸性 pH 条件下，苯丙胺类药物的氨基基团质子化，从而分析物可以通过疏水作用和强阳离子交换作用被高效的保留在 Plexa PCX 聚合物吸附剂上。

用 100%甲醇淋洗可消除大部分的基质干扰，但吸附剂上的分析物没有损失。为了打破苯丙胺类药物与强阳离子吸附剂之间的离子相互作用，在有机洗脱液中添加了一种强碱。在进行样品洗脱之前，将 20% 氢氧化铵溶液添加到组成为 50%乙酸乙酯和 50%甲醇的双组分洗脱剂中，以提高回收率。

苯丙胺类药物易挥发，并且容易在样品制备过程中随溶剂的蒸发而损失，除非加入盐酸将其以盐的形式沉淀。最好在蒸发即将结束时加入 HCl，以避免形成会造成离子抑制的氯化铵盐。

图 2 显示了采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18，3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱可出色地实现 5 种苯丙胺类药物与 SAMHSA 规定的潜在干扰物的分离，并且分析可在 3.2 min 内完成。液相色谱分离首先采用低有机溶剂比例（15%）的流动相，使尿液中的盐类和其它极性成分在样品运行开始时先被洗脱。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液，以尽量减少离子源污染。切换阀将液流转至质谱检测器后即刻开始数据采集。0.8 mL/min 的流速可获得较短的分析时间和再平衡时间。

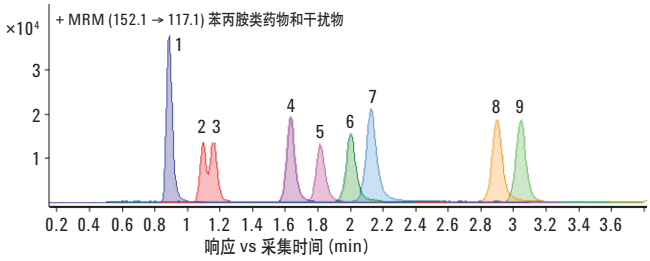


图 2. 苯丙胺类药物与其潜在干扰物在 Agilent Poroshell 120 EC-C18，3×50mm，2.7 µm 色谱柱上分离的叠加 MRM 提取离子色谱图。每个分析物的浓度均为 50 ng/mL。色谱峰按洗脱顺序分别为: 1. 苯丙醇胺；2. 麻黄碱；3. 伪麻黄碱；4. 苯丙胺；5. 甲基苯丙胺；6. MDA；7. MDMA；8. MDEA；9. 芬特明

进行多种化合物分析时，推荐使用利用一个特定转换离子，通过保留时间和 ΔRT（时间窗）调整的动态 MRM 方法。当确定干扰组分可以完全分离出去时，我们就可以只关注五种苯丙胺类药物的数据采集，此时可在 1.2 min 而非 0.6 min（MS 方法的第 1 个时间段）将切换阀从废液瓶转向 MS 检测器。

SAMHSA 准则要求分析目标化合物和内标物时必须使用一个定量离子和至少一个定性离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1)信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物名称	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
苯丙胺	136.1	119.1	64	4
苯丙胺	136.1	91.1	64	14
苯丙胺-D_6	142.1	125.1	66	5
苯丙胺-D_6	142.1	93.1	66	13
MDA	180.1	163.1	92	5
MDA	180.1	105.1	92	17
MDA-D_5	185.1	168.1	68	5
MDA-D_5	185.1	110.1	68	21
MDEA	208.1	163.1	88	8
MDEA	208.1	133.1	88	17
MDEA	208.1	105.1	88	21
MDEA-D_6	214.2	166.1	90	8
MDEA-D_6	214.2	108.1	90	25
MDMA	194.1	163.1	84	5
MDMA	194.1	135.1	84	17
MDMA	194.1	105.1	84	21
MDMA-D_5	199.1	165.1	82	4
MDMA-D_5	199.1	107.1	82	25
甲基苯丙胺	150.1	119.1	80	4
甲基苯丙胺	150.1	91.1	80	16
甲基苯丙胺-D_9	159.2	125.2	77	5
甲基苯丙胺-D_9	159.2	93.1	77	13
麻黄碱-伪麻黄碱	166.1	133.1	80	21
芬特明	150.1	133.1	80	6
苯丙醇胺	152.1	117.1	80	20

5 种苯丙胺类药物的定量色谱峰在样品浓度为 25 ng/mL 时获得的信噪比均超过 400: 1（如图 3，上图所示。图中标注了 MDEA 定量色谱峰的 S/N 值）。这说明了 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能，能够非常可靠地检测远低于 SAMHSA 限量浓度的 5 种苯丙胺类药物。

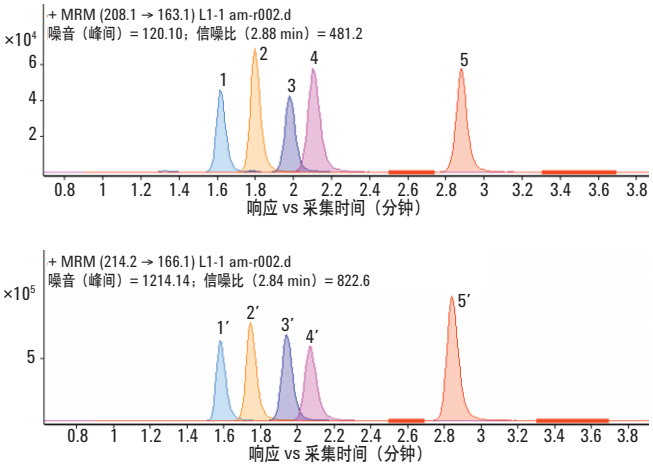


图 3. 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50mm，2.7 µm 色谱柱分析尿液提取物中的苯丙胺类药物（25 ng/mL）与各内标物（500ng/mL）的定量峰重叠 MRM 提取离子色谱图。色谱峰按洗脱顺序分别为：上图：1. 苯丙胺；2. 甲基苯丙胺；3. MDA；4. MDMA；5. MDEA，下图：1′. 苯丙胺-D6；2′. 甲基苯丙胺-D9；3′. MDA-D_5；4′. MDMA-D_5；5′. MDEA-D_6。噪声区域以加粗的形式显示

图 4 给出了 5 个浓度水平的尿液提取物中标准品的校准曲线。通过分别向阴性尿液中加入各苯丙胺类药物标准品，制备浓度分别为 25、250、1000、5000 和 10,000 ng/mL 的一系列校准标准溶液。每种分析物的氘代内标浓度为 500 ng/mL。各曲线优异的线性关系（$R^2 > 0.999$）表明该方法在很宽的动态浓度范围内呈线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

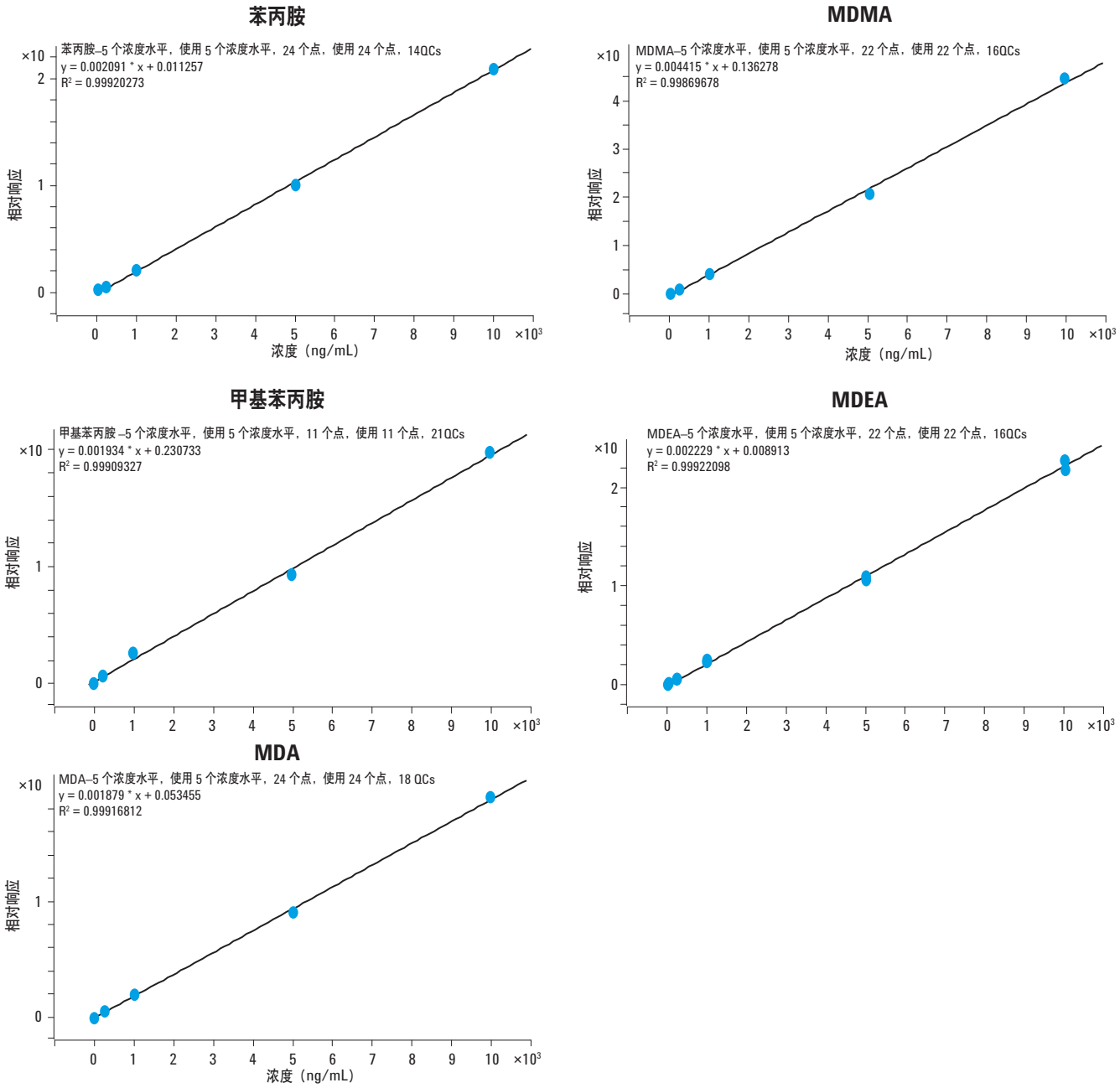


图 4. 尿液提取物中五种苯丙胺类药物的校准曲线示例。浓度范围从 25 到 10,000 ng/mL。线性相关系数 $R^2 > 0.999$

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的五种苯丙胺类药物预加到阴性尿液中，然后进行 SPE 萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用相同的方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入五种苯丙胺类药物标准品到 250 ng/mL（固相萃取后加标），平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（即复溶溶剂），使其浓度为 250 ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。 萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的提取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得的。

表 2 显示五种苯丙胺类药物的萃取回收率均大于等于 94%，五种分析物中的四种处理效率高于 90%；只有苯丙胺的处理效率是 86%。较高的基质效应（91-99%）表明只有 1-9%的信号由于离子抑制作用而损失。从而证明了经 Plexa 处理的提取物纯净度极高。同时该方法具有极高的准确度（目标物浓度的±10%以内）和极好的精密度（CV < 1.1%）。

结论

本文所描述的固相萃取样品制备与 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全遵循 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高精密度、准确度和重现性的有法律效力的数据结果。其 硬件配置与 2011 版 SAMHSA 方法中的相同均来自安捷伦。这些方法特别为安捷伦 1100 和安捷伦 1200 LC 系列的所有用户开发，这些 LC 系统的背压均不超过 400 bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，离子源参数可以很容易地修改。安捷伦科技可提供电子版本的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

表 2. 分析方法评价，n = 5

参数	苯丙胺	甲基苯丙胺	MDA	MDMA	MDEA
处理效率 * (%)	86	93	91	93	95
萃取回收率 * (%)	94	94	95	97	96
基质效应 * (%)	91	99	95	96	98
准确度 ** (%)	107	105	92	101	106
精密度 (CV)**(%)	0.6	0.5	1.1	0.5	0.3

* 限量浓度条件下测定

** 苯丙胺 、MDA、MDMA 和 MDEA 在限量浓度的 40%条件下测定 ，甲基苯丙胺在限量浓度条件下测定

参考文献

1. Anon (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/
2. R. Baselt, (2008) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man.* 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. J. Hughes, and P. Moorman, (2011) "Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing". Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem.
4. B. K. Matuszewski, M. L.Constanzer, and C. M. Chavez-Eng, (2003) "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS". *Analytical Chemistry*, 75: 3019-3030.
5. P. Moorman and J. Hughes, (2010) "Amphetamines (expanded) in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS)". SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5865EN.
6. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.
7. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller, (2010) "A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples II: amphetamine, methamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyethylamphetamine, phencyclidine, and (±)-11-nor-9-carboxy-Δ9 – tetrahydrocannabinol". *Journal of Analytical Toxicology*, 34: 430-443.

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

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（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 13 日，中国印刷
5990-9623CHCN

Agilent Technologies

应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 和 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯甲酰爱康宁进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用与精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室采用 LC/MS/MS 法确认初步药物测试结果。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生步骤，因此它远比以前应用的 GC/MS 法要简便的多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的苯甲酰爱康宁的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六种简便检测方法之一，该方法主要使用安捷伦产品进行分析，包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂，Agilent Poroshell 120 EC-C18，2.7µm 表面多孔 LC 色谱柱，Agilent 1200 Infinity LC 系统以及采用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

苯甲酰爱康宁（BE）是可卡因存在于尿液中的一种主要代谢产物，可卡因是强烈的具有成瘾性的神经系统兴奋剂和局部麻醉剂。可卡因可在酶催化下水解为苯甲酰爱康宁（发生在肝脏），也可以不经过酶催化，而在碱性 pH 条件下生成苯甲酰爱康宁（Anon.，2011）。苯甲酰爱康宁可在摄入可卡因后的几天内在尿液中检出。在冷冻贮藏的尿样中苯甲酰爱康宁相对稳定，而在较高温度和碱性条件下，它能进一步发生水解。SAMHSA 规定苯甲酰爱康宁的最高限量浓度为 100 ng/mL，其检测限为限量浓度的 10%，即 10 ng/mL。

由于 Agilent Bond Elut Plexa 吸附剂的独特性质，本文所描述的提取方法实现了对苯甲酰爱康宁萃取的高回收率提取，且重复性好。不像其它聚合物吸附剂，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重现性的实现，主要得益于 Plexa 柱填料的窄粒径分布，并且不存在容易导致堵塞的细颗粒。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18，3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱是由于其具有较高的载样量和极佳的分离性能。填充表面多孔 2.7 µm 颗粒的 Poroshell 120 色谱柱能提供与亚 2 µm UHPLC 色谱柱类似的柱效，但其背压却减少了约 40%。因此，它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规液相系统上采用较高的流速来提高分辨率，并同时缩短分析时间和再平衡的时间。

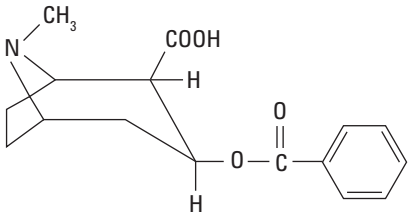
在较小的样品进样体积（2 µL）且无样品预富集的条件下，该方法具有极佳的信噪比（样品浓度 10 ng/mL 时>400:1，此浓度是 SAMHSA 规定限量浓度的 10%），这得益于采用了 AJST 技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发, 2010）采用的是 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品和操作步骤。

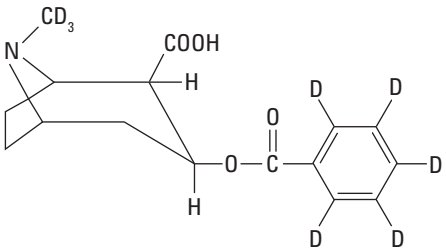
实验部分

分析物

药物标准品购自 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（苯甲酰爱康宁）和 100 µg/mL（苯甲酰爱康宁-D_8）的甲醇溶液。



苯甲酰爱康宁
Log P（预测值）-0.73–2.26
pK_{a1} 10.1



苯甲酰爱康宁-D_8

图 1. 苯甲酰爱康宁分析物及其化学结构。log P 预测值来自 DrugBank, ChemSpider, PubChem

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg，3 mL（部件号 12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号 12234100）
- Agilent 截止阀（部件号 12234520）
- Agilent 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号 5182-0716）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号 5182-0717）

SPE

- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱（部件号 699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机，低延迟体积配置的 1312B 二元泵，G1367E 自动进样器，G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

预处理

往 1 mL 尿液中加入内标，使其浓度为 200 ng/mL；推荐使用 12 x 75 mm 玻璃试管。加入 1 mL 2%甲酸溶液，涡旋，如溶液浑浊则离心。

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后使其自然滴出
2. 上样或加载上清液
3. 淋洗 1：1 mL 2%甲酸溶液
4. 淋洗 2：1 mL 甲醇
5. 在真空（10–15 英寸汞柱）条件下，抽干 5–10 分钟
6. 用 1 mL 新鲜配制的甲醇: 氢氧化铵（100: 20）溶液洗脱。先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后用低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
7. 氮气吹干
8. 用 1 mL 初始流动相（10%甲醇，90%水，0.1%甲酸）复溶

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1%甲酸水溶液	
流动相 B	0.1%甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	10
	0.5	10
	2.5	70
	2.51	90
	5.5	90
	5.51	10
停止时间	5.6 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	2 µL	
进样并洗针		
洗针	用 75: 25 甲醇：水溶液冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数	
离子检测模式	正离子
毛细管电压	3,000 V
干燥气流速	10 L/min
干燥气温度	350 °C
雾化气压力	35 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	400 °C
喷嘴电压	0 V
MS 参数	
扫描类型	MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.2 min-切换阀到 MS
Delta EMV(+)	200 V

结果与讨论

在酸性 pH 条件下，苯甲酰爱康宁的叔胺基团质子化，从而分析物可以通过疏水保留与强阳离子交换作用被高效的保留在 Plexa PCX 聚合物吸附剂上。

用 100%甲醇淋洗 SPE 小柱能消除大部分的基质干扰，同时不会造成 BE 损失。向有机洗脱液中添加一种强碱，目的是破坏分析物和强阳离子交换吸附剂间的离子相互作用。在样品洗脱前，将 20% NH_4OH 溶液加到甲醇中，以提高苯甲酰爱康宁的回收率。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18，3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱能实现尿液萃取物中苯甲酰爱康宁的快速分离，并可获得极佳的峰形（如图 2 所示）。液相色谱分离首先采用低有机溶剂比例（10%）的流动相，从而使尿液中的盐类和其它极性成分在样品运行开始时先被洗脱。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液（0 到 1.2 分钟），使离子源污染最小化。在第 1.2 分钟时切换阀将液流转至质谱检测器后立即开始数据采集。流速 0.8 mL/min 条件下，可获得较短的分析时间和再平衡时间。

浓度为 10 ng/mL 时，色谱峰的信噪比>400:1（如图 2，上图所示）。这表明 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能，能够可靠地检测远低于 SAMHSA 规定限量浓度的苯甲酰爱康宁（10%）。

SAMHSA 法规要求分析目标分析物和内标物时必须监测一个定量离子和至少一个定性的离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1）信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
BE	290.1	168.1	90	15
BE	290.1	105.1	90	30
BE	290.1	82.1	90	32
BE-D_5	298.2	171.1	90	15
BE-D_5	298.2	110.1	90	30

图 3 是五个浓度水平的尿液萃取物中苯甲酰爱康宁标准品的校准曲线。通过向阴性尿液中加入苯甲酰爱康宁标准品，制备浓度分别为 10、100、500、1000 和 4000 ng/mL 的 BE 系列校准标准溶液。添加氘代内标物 BE-D_8 的浓度为 200 ng/mL。线性关系极为优异，线性相关系数 R^2 = 0.998 证明本方法在一个较宽的动态浓度范围内具有极佳的线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

本方法采用 MRM 扫描模式，设置为常态而非动态检测，因为动态 MRM 模式对单一化合物的检测没有优势。

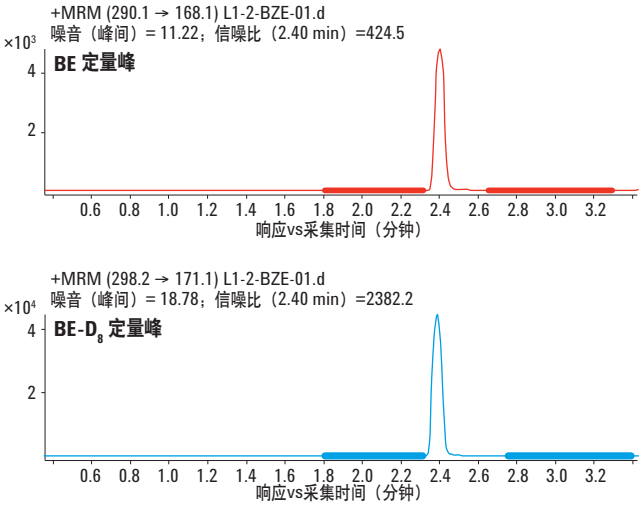


图 2. 尿液萃取物中 BE（10 ng/mL）和 BE-D_8（200 ng/mL）的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18，3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱。噪声区域以加粗的形式显示

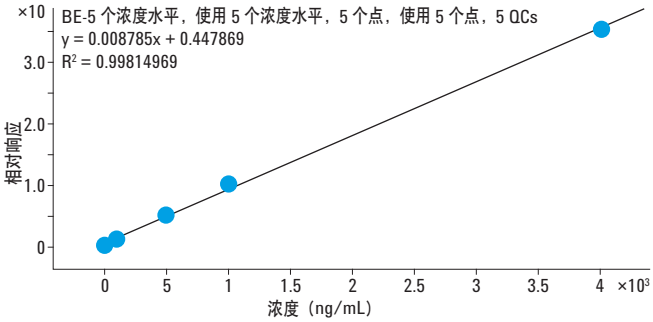


图 3. 尿液萃取物中苯甲酰爱康宁的校准曲线示例。校准浓度范围 10 到 4000 ng/mL，线性相关系数 R^2 = 0.998

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的 BE 预加到阴性尿液中，然后进行萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用同样方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入苯甲酰爱康宁至 100 ng/mL，平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（即复溶溶剂），使其浓度为 100ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。 萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的提取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。

准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得。

表 2 数据表明本方法分析苯甲酰爱康宁具有较高的萃取回收率（86%），同时也获得了极佳的准确度（102%）和精密度（0.7%）。99%的基质效应表明只有 1%的信号因基质干扰引起的微弱离子抑制作用而损失，从而证明了经 Plexa 吸附剂处理的提取物具有优异的纯净度。

表 2. 在限量浓度条件下进行方法评价，n = 5

	%
处理效率 *	85
萃取回收率 *	86
基质效应 *	99
准确度 **	102
精密度 **（CV）	0.7

* 在限量浓度条件下测定
** 在 40%限量浓度条件下测定

结论

本文所描述的固相萃取样品制备与 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全符合 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高准确度、高精密度、高重现性的有法律效力的数据结果。其硬件配置与 2011 版 SAMHSA 方法中的相同均来自安捷伦。这些方法特别为安捷伦 1100 和安捷伦 1200 LC 系列的所有用户开发，这些 LC 系统的最高背压均不超过 400bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，离子源参数可以很容易地进行修改。安捷伦科技可提供电子版本的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

参考文献

1. Anon. (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/
2. R. Baselt (2008) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. K. E. Billings (2003) "Development of a Simple Method to Detect and Quantify Benzoylecgonine, a Cocaine Metabolite, in Urine". Honors Projects. Paper 5. Illinois Wesleyan University. http://digitalcommons.iwu.edu/chem_honproj/5
4. J. Hughes and P. Moorman (2011) "Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing". Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem/cn.
5. P. M. Jeanville, E. S. Estapé, S. R. Needham, and M. J. Cole (2000) "Rapid confirmation/quantitation of cocaine and benzoylecgonine in urine utilizing high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11 (3): 257-263.
6. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng (2003) "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS". *Analytical Chemistry*, 75: 3019-3030.
7. P. Moorman and J. Hughes (2010) "Benzoylecgonine in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS)". SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5866EN.
8. SAMHSA (2010) "Manual for Urine Laboratories", National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.
9. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller (2009) "A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples for morphine, codeine, 6-acetylmorphine, and benzoylecgonine". *Journal of Analytical Toxicology*, 33: 398-408.

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

©安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012 年 1 月 10 日，中国印刷
5990-9624CHCN

Agilent Technologies

应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的阿片类药物（吗啡和可待因）进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用与精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室采用 LC/MS/MS 法确认初步药物测试结果。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生步骤，因此它远比以前应用的 GC/MS 法要简便的多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的阿片类药物的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六种简便检测方法之一，该方法主要使用安捷伦产品进行分析，包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 柱，Agilent Poroshell 120 EC-C18，2.7 µm 表面多孔 LC 色谱柱，Agilent 1200 Infinity LC 系统以及应用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

阿片类药物（吗啡和可待因）是在罂粟树脂中发现的天然生物碱。可待因是目前世界上使用最广泛的阿片类药物。除了吗啡和可待因的检测，SAMHSA 准则还要求该分析方法应具备使这些药物与其结构类似化合物分离的能力，这些结构类似化合物包括半合成的阿片类药物：氢吗啡酮、羟吗啡酮、氢可酮、羟考酮和可待因的代谢产物去甲可待因。所有这些药物均可与人类的阿片受体结合发挥作用。除了作为止痛处方药使用外，它们还用于娱乐用途，并且可导致阿片类药物依赖，高剂量的阿片类药物/鸦片可导致呼吸衰竭而致人死亡。

吗啡和可待因在体内均可广泛代谢。吗啡主要代谢为吗啡-3-葡萄糖苷酸和吗啡-6-葡萄糖苷酸。可待因的主要代谢产物是吗啡、可待因-6-葡萄糖苷酸和去甲可待因。由于在尿液中发现的吗啡和可待因均主要以葡萄糖苷酸缀合物的形式存在，因此 SAMHSA 要求测定每一种化合物的总浓度。分析前必须将葡萄糖苷酸缀合物完全转换为母体药物。确保游离的阿片类药物完全转化的最可靠的转换方法是酸水解。过去常用的酶解法已被证实不能使母体化合物转换完全，这可能会导致假阴性的结果（Wang 等，2006）。

SAMHSA 规定吗啡和可待因的最高限量浓度为 2000 ng/mL。由于预计在一些尿样中可能出现高浓度的阿片类药物（还有安非他明），我们选择使用更高容量的 3mm id Agilent Poroshell 120 色谱柱代替所有以前安捷伦 SAMHSA 方法中的 2mm id 色谱柱。与亚 2 µm 的 UHPLC 色谱柱相比，填充了 2.7 µm 表面多孔颗粒的 Poroshell 120 色谱柱具有与其相似的柱效，但其背压却减少了 40%左右。因此，它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规 LC 系统上通过使用更高的流速来提高分辨率，同时缩短分析时间和再平衡时间。

由于 Agilent Bond Elut Plexa 的独特性质，本文所描述的提取方法获得了吗啡和可待因极高的回收率，且重复性好。不像其它聚合物吸附剂，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重复性的实现，主要得益于色谱柱填料的窄粒径分布，并且不含易引起堵塞的细颗粒。

在较小的样品进样体积（2 µL）和无预富集的条件下，该方法对吗啡和可待因均获得了极佳的信噪比（样品浓度 200 ng/mL 时 >150:1，该浓度为 SAMHSA 规定限量浓度的 10%），这得益于应用了 AJST 技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发，2010）采用了 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品及操作步骤。

实验部分

分析物

药物标准品购自 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（吗啡、可待因、氢吗啡酮、去甲可待因、氢可酮、羟考酮、羟吗啡酮和吗啡 3 -葡萄糖苷酸）和 100 µg/mL（吗啡-D_6 和可待因-D_6）的甲醇溶液。

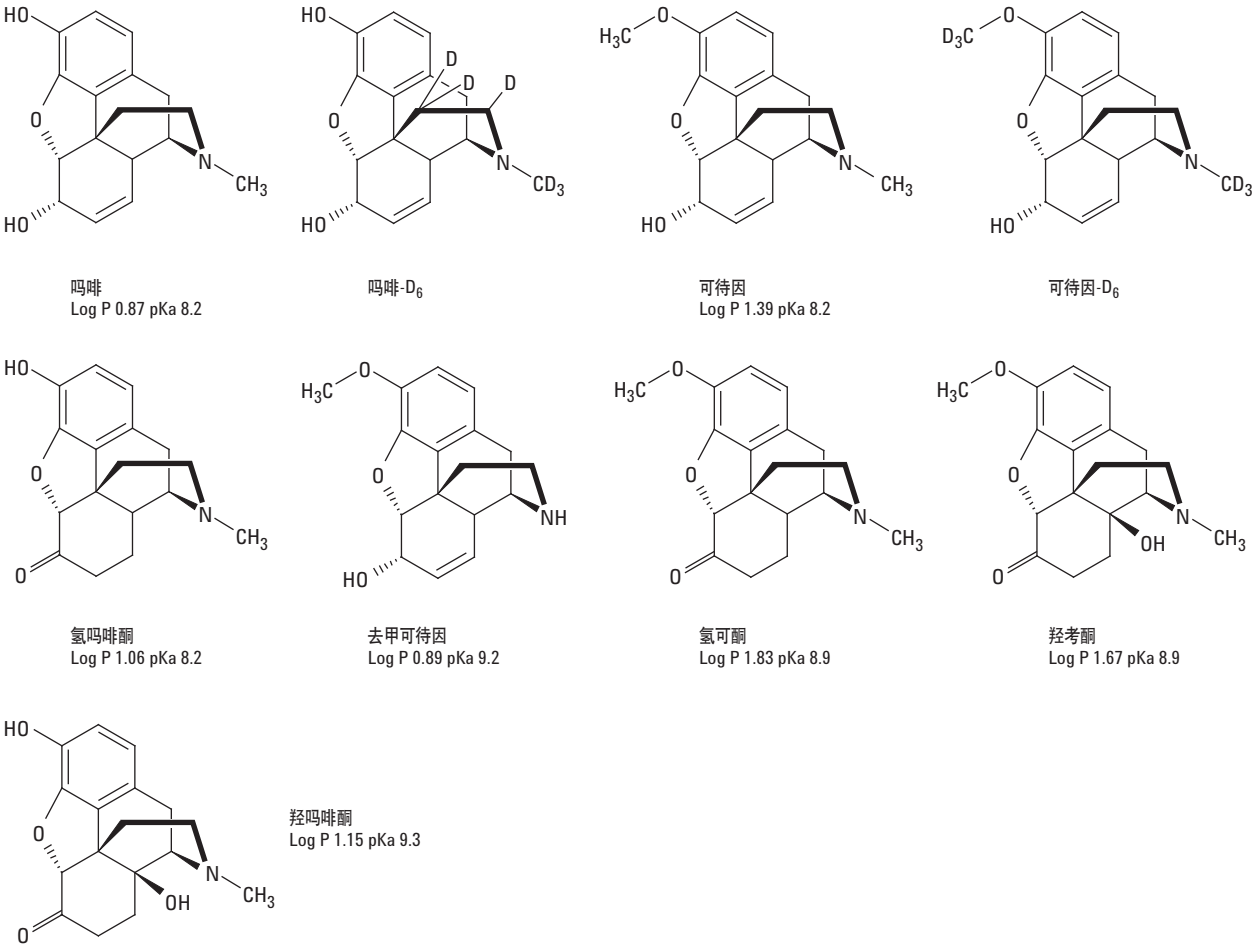


图 1. 阿片类分析物及其结构

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg，3 mL（部件号 12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号 12234100）
- Agilent 截止阀（部件号 12234520）
- Agilent 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号 5182-0716）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号 5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱（部件号 699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机、低延迟体积配置的 1312B 二元泵、G1367E 自动进样器、G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

水解与样品预处理

1. 往 0.5 mL 尿液中加入内标，使其浓度为 1000 ng/mL；推荐使用 12 × 75mm 玻璃试管
2. 加入 125 µL 浓盐酸
3. 在加热装置中于 95 ±5 °C 水解 90 min
4. 冷却。然后加入 2 mL 0.1 M 醋酸钠缓冲液（pH 4.5）
5. 用 250 µL 7 M 的 KOH 溶液中和，涡旋，测定其 pH 值，应小于 6
6. 以 6000 rpm 的速度离心 20min

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后使其自然滴出
2. 上样或加载上清液
3. 淋洗 1：1 mL 2%甲酸溶液
4. 淋洗 2：1 mL 甲醇
5. 在真空（10-15 英寸汞柱）条件下，抽干 5-10 分钟
6. 用 2 mL 新鲜配制的甲醇：氢氧化铵（100: 20）溶液洗脱。先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后用低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
7. 在 40 °C 下蒸干
8. 用 0.5 mL 初始流动相（5%甲醇，95%水，0.1%甲酸）复溶

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1%甲酸水溶液	
流动相 B	0.1%甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	5
	0.5	5
	1.5	25
	2.5	55
	2.6	90
	5.6	90
	5.7	5
停止时间	5.8 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	2 µL	
进样并洗针		
洗针	用甲醇: 水（75: 25）冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数

离子检测模式	正离子
毛细管电压	3,000 V
干燥气流速	10 L/min
干燥气温度	350 °C
雾化气压力	35 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	400 °C
喷嘴电压	0 V

MS 参数

扫描类型	动态 MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.0min-切换阀到 MS
Delta EMV (+)	0 V

结果与讨论

在酸性 pH 条件下，吗啡、可待因及其衍生物的叔胺基团质子化，从而分析物可以通过疏水作用和强阳离子交换作用被高效的保留在 Plexa PCX 聚合物吸附剂上。

用 100%甲醇淋洗 SPE 小柱可消除大部分的基质干扰而不会造成阿片类药物损失。在有机洗脱液中添加强碱，以破坏分析物与强阳离子交换吸附剂之间的离子相互作用。在进行样品洗脱之前，将适量 20%氢氧化铵溶液添加到甲醇中，以提高阿片类药物的回收率。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50mm，2.7 µm 色谱柱能实现阿片类药物及其潜在干扰化合物的良好分离，并获得了极佳的峰形，同时分析可在 2.5min 内完成（如图 2 所示）。液相色谱分离首先采用低有机溶剂比例（5%）的流动相，使尿液中的盐类和其它极性成分在样品运行开始时先被洗脱。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液（0 到 1 min），以尽量减少离子源污染。1.0 min 时切换阀将液流转至质谱检测器后即刻开始数据采集。0.8 mL/min 的流速可获得较短的分析时间和再平衡时间。

在图 2 所示色谱图中，只有可待因和去甲可待因这一对色谱峰（峰 4 和 5）部分分离，但由于这些化合物具有不同的母离子和转换离子， 因此可待因定量时去甲可待因信号所产生的任何可能的干扰都可以排除。

在另一项实验中，测试了 Plexa PCX 吸附剂是否存在使去甲可待因甲基化并转换为可待因的可能性。试验结果均为阴性；在添加了去甲可待因标准品的阴性尿样中并未检测到可待因，因此本文可采用上述提取方法。

在进行干扰物测试时，推荐使用利用一个特定转换离子，通过保留时间和 ΔRT（时间窗）调整的动态 MRM 方法。当然，一旦确定干扰组分已经分离出去，吗啡、可待因及其内标物的数据采集即可通过常规的 MRM 进行。

SAMHSA 准则要求分析目标化合物和内标物时必须使用一个定量离子和至少一个定性离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1）信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
可待因	300.2	215.1	130	23
可待因	300.2	165.1	130	46
可待因	300.2	153.1	130	50
可待因-D_6	306.2	165.1	130	44
可待因-D_6	306.2	218.1	130	23
吗啡	286.1	201.1	130	23
吗啡	286.1	181.1	130	40
吗啡	286.1	165.1	130	43
吗啡 -D_6	292.1	181.1	130	40
吗啡 -D_6	292.1	165.1	130	42
吗啡-3-葡萄糖苷酸	462.2	286.1	162	45
羟考酮	316.2	298.1	130	15
羟吗啡酮	302.2	284.1	130	17
氢可酮	300.2	199.1	130	30
去甲可待因	286.1	225.1	130	20
氢吗啡酮	286.1	185.1	130	28

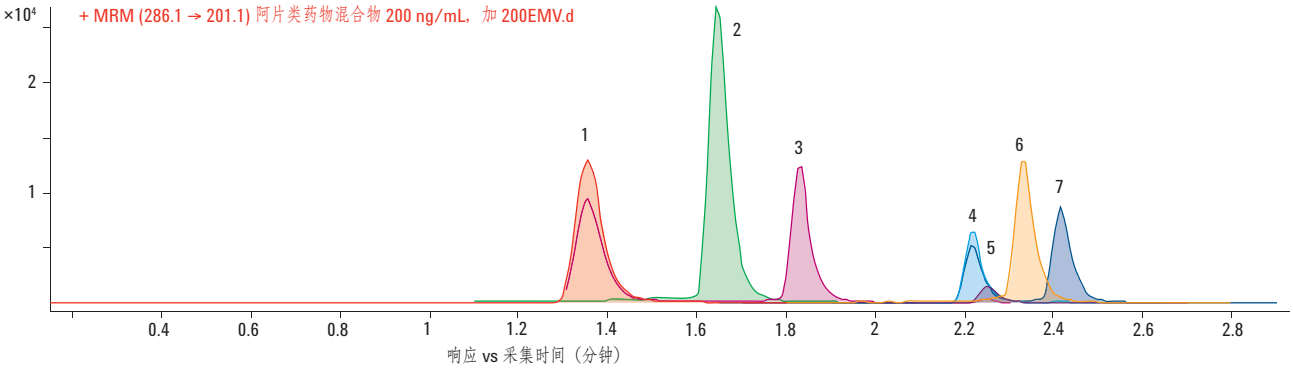


图 2. 阿片类药物与其潜在干扰物在 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50mm，2.7 µm 色谱柱上分离的叠加 MRM 提取离子色谱图。各分析物在尿液中的浓度均为 200 ng/mL。色谱峰按洗脱顺序分别为：1、吗啡；2、羟吗啡酮；3、氢吗啡酮；4、可待因；5、去甲可待因（紫红色小峰）；6、羟考酮；7、氢可酮

按照上述步骤处理样品时，尿液中加标浓度为 10,000 ng/mL 的吗啡-ß-3-葡萄糖苷酸标准品有 97-99.2%转换为吗啡。吗啡-ß-3-葡萄糖苷酸分析所用的 MS 参数列于表 1 中，供有兴趣检测水解效率的分析人员参考。

吗啡和可待因的定量峰在浓度为 200 ng/mL 时获得的信噪比超过 150: 1（如图 3，上面的 1 和 2 图所示）。这说明 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能，能够非常可靠地检测远低于 SAMHSA 限量浓度的阿片类药物。

图 4 给出了 5 个浓度水平的尿液提取物中标准品的校准曲线。通过分别向阴性尿液中加入吗啡和可待因标准品，制备两者浓度分别为 200、1000、2000、10000 和 2000 0 ng/mL 的一系列校准标准溶液。添加氘代内标吗啡-D6 和可待因-D6 的浓度均为 1000ng/mL。各曲线良好的线性关系（$R^2 \geq 0.998$）表明该方法在很宽的动态浓度范围内呈线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

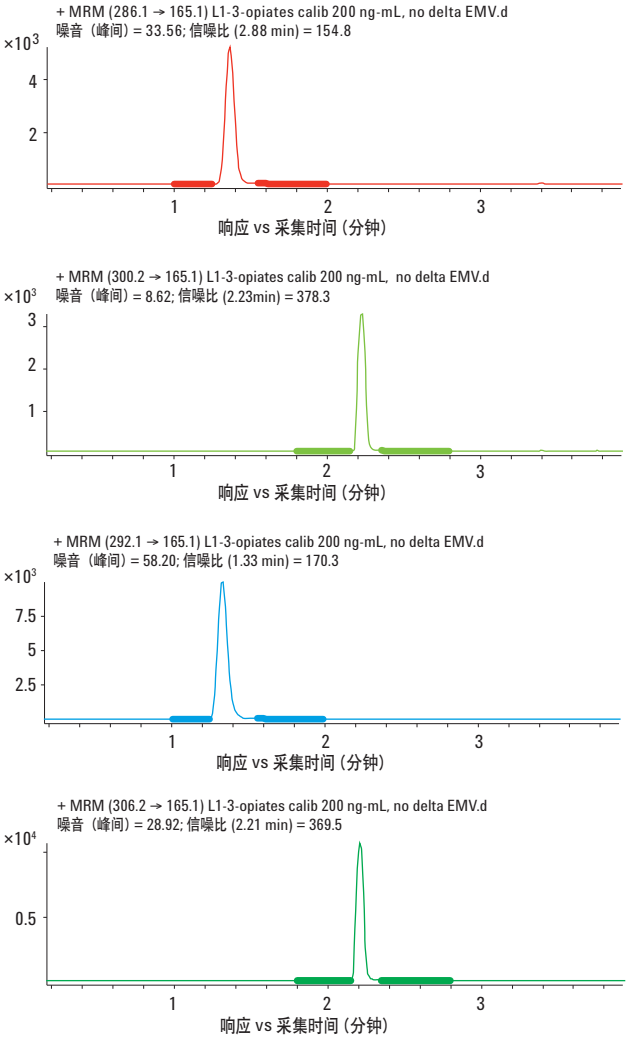


图 3. 尿液提取物中吗啡与可待因（200 ng/mL）和吗啡-D6 与可待因-D6（1000 ng/mL）的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱。噪声区域以加粗的形式显示

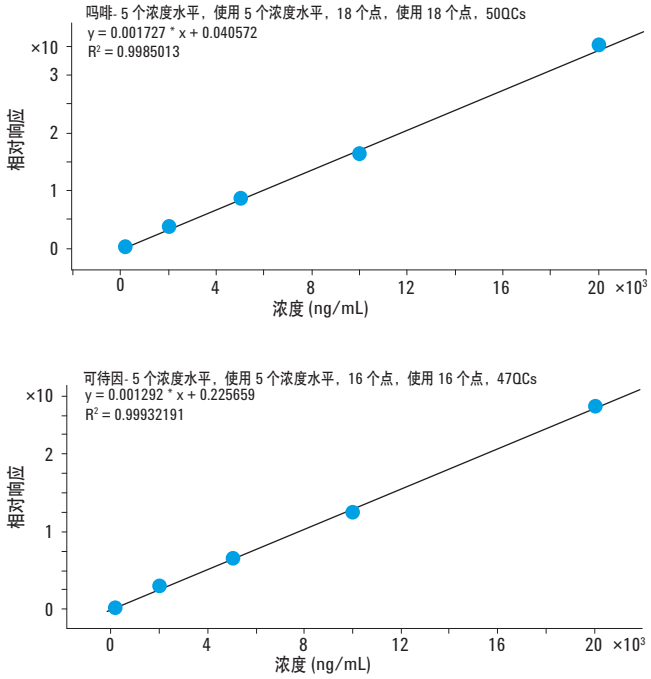


图 4. 从尿液中提取的吗啡（上图）和可待因（下图）的校准曲线示例。浓度范围为 200 至 20 000 ng/mL。线性相关系数 $R^2 \geq 0.998$

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的吗啡和可待因预加到阴性尿液中，然后进行 SPE 萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用相同的方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入吗啡和可待因标准品到 2000 ng/mL（固相萃取后加标），平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（即复溶溶剂），使其浓度为 2000 ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

表 2. 在限量浓度条件下阿片类药物的分析方法评价，n= 5

参数	吗啡	可待因
处理效率（%）	83	85
萃取回收率（%）	85	86
基质效应（%）	98	99
准确度（%）	108	108
精密度（CV）（%）	0.6	0.7

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的提取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得的。

表 2 显示了吗啡和可待因的高提取回收率和高处理效率（约 85%）。高基质效应（98-99%）表明只有 1-2%的信号由于离子抑制作用而损失，从而证明了经 Plexa 吸附剂处理的提取物具有优异的纯净度。同时该方法具有高准确度（目标物浓度的±10%之内）和极好的精密度（CV <1%）。

结论

本文所描述的固相萃取样品制备与 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全遵循 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高重现性的有法律效力的数据结果。其硬件配置与 2011 版 SAMHSA 方法中的相同均来自安捷伦。这些方法特别为安捷伦 1100 和安捷伦 1200 LC 系列的所有用户开发，这些 LC 系统的背压不超过 400 bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，离子源参数可以很容易地进行修改。安捷伦科技可提供电子版的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

参考文献

1. Anon (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/
2. R. Baselt (2008) Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. J. Hughes and P. Moorman (2011) Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing. Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem/cn.
4. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Analytical Chemistry, 75: 3019-3030.
5. P. Moorman and J. Hughes (2010) Opiates (morphine and codeine) in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS). SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5875EN.
6. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.

7. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller (2009) A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples for morphine, codeine, 6-acetylmorphine, and benzoylecgonine. Journal of Analytical Toxicology, 33: 398-408.

8. P. Wang, J. A. Stone, K. H. Chen, S. F. Gross, C. A. Haller, and A. H. Wu (2006) Incomplete recovery of prescription opioids in urine using enzymatic hydrolysis of glucuronide metabolites. Journal of Analytical Toxicology, 30: 570-575.

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 13 日，中国印刷
5990-9625CHCN

Agilent Technologies

应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 和 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯环利啶进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用和精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室采用 LC/MS/MS 法确认初步药物测试结果。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生操作，因此它远比以前使用的 GC/MS 法要简便得多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的苯环利啶的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六种简便检测方法之一，该方法主要使用安捷伦产品进行分析，包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂，Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.7 µm 表面多孔 LC 色谱柱，Agilent 1200 Infinity LC 系统以及应用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

苯环利啶（PCP）是一种合成药物，为解离型麻醉药的一种。其致幻性和神经毒性作用为人所熟知，并且在高剂量时，它可对人体造成永久性损害。5-20%的 PCP 以原型药物形式从尿液中排出（Baselt，2008）。因此，它以药物原型的形式即可被检测到，无需水解和测量其代谢物。摄入药物后的数天内均可在尿液中检测到 PCP。在生物样品中它的稳定性良好。含有 PCP 的冷冻尿样可以贮存达一年，而且仅需 4 ºC 冷藏即可满足短期贮存要求。

苯环利啶有一个 3 环结构，包括一个苯环、一个环己烷环和一个哌啶环（如图 1 所示）。它是一种弱有机碱，几乎呈非极性，并有较高的 logP 值，为 4.69（Drug Bank）。SAMHSA 最新规定苯环利啶的最高限量浓度为 25 ng/mL，其 10% 为检测限，即 2.5 ng/mL。

由于 Agilent Bond Elut Plexa 吸附剂的独特性质，本文所描述的简单提取方法可获得 PCP 的高回收率提取，且重复性好。不像其它聚合物吸附剂，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重复性的实现，主要得益于色谱柱填料的窄粒径分布，并且不含易引起堵塞的细颗粒。

我们选择了具有高容量和极佳分离性能的 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱。与亚 2 µm UHPLC 色谱柱相比，填充了表面多孔 2.7 µm 颗粒的 Poroshell 120 色谱柱与其具有相似的柱效，但背压却减少了 40%左右，因此，它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规 LC 系统上采用更高的流速来提高分辨率，并同时缩短分析时间和再平衡时间。

本方法在较小的样品进样体积（2 µL）和无预富集的条件下，获得了极佳的信噪比（样品浓度 2.5 ng/mL 时>200:1，该浓度只有 SAMHSA 规定限量浓度的 10%），这得益于应用了 AJST 技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发，2010）采用了 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品及操作步骤。

实验部分

分析物

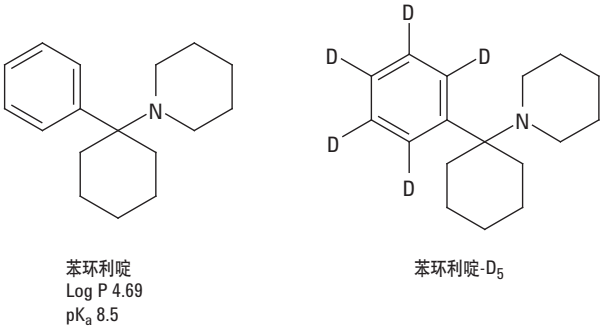


图 1. 苯环利啶分析物及其化学结构

药物标准品购自 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（苯环利啶）和 100 µg/mL（苯环利啶-D_5）的甲醇溶液。

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg, 3 mL（部件号 12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号 12234100）
- Agilent 截止阀（部件号 12234520）
- Agilent 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号 5182-0716）或硅烷化样品小瓶（部件号 5183-2072）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号 5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱（部件号 699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机、配置低延迟体积的 1312B 二元泵、G1367E 自动进样器、G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

预处理

往 1 mL 尿液中加入内标，使其浓度为 50 ng/mL；推荐使用 12 × 75 mm 玻璃试管。加入 1 mL 2%甲酸溶液，涡旋；如果溶液浑浊则离心。

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后使其自然滴出
2. 上样/加载上清液
3. 淋洗 1：1 mL 2%甲酸溶液
4. 淋洗 2：1 mL 甲醇
5. 在真空（10-15 英寸汞柱）条件下，抽干 5-10 分钟
6. 用 1 mL 新鲜配制的乙酸乙酯：甲醇：氢氧化铵（80: 20: 5）溶液进行洗脱。先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后用低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
7. 氮气吹干
8. 用 1 mL 初始流动相（10%甲醇、90%水、0.1%甲酸）复溶

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1%甲酸水溶液	
流动相 B	0.1%甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	10
	0.5	10
	2.5	70
	2.51	90
	5.5	90
	5.51	10
停止时间	5.6 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	2 µL	
进样并洗针		
洗针	用 75: 25 的甲醇：水冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数

离子检测模式	正离子
毛细管电压	3,000 V
干燥气流速	10 L/min
干燥气温度	350 °C
雾化气压力	35 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	400 °C
喷嘴电压	0 V

MS 参数

扫描类型	MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.2 min –切换阀到 MS
Delta EMV (+)	200 V

结果与讨论

在酸性条件下，苯环利啶的叔胺基团质子化，从而分析物可以通过疏水作用与强阳离子交换作用被高效的保留在 Agilent Bond Elut Plexa PCX 聚合物吸附剂上。

用 100%甲醇洗脱 SPE 小柱可以去除大部分的基质干扰而无 PCP 的流失。向有机洗脱液中添加强碱，以破坏分析物与强阳离子交换吸附剂之间的离子相互作用。在样品洗脱之前，将 5% 氢氧化铵溶液添加到乙酸乙酯-甲醇（80:20）中，以提高 PCP 的回收率

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱可实现尿液萃取物中苯环利啶的快速分离，并可获得良好的峰形（如图 2 所示）。液相色谱分离首先采用低有机溶剂比例（10%）的流动相，从而使尿液中的盐类和其它极性成分在样品运行开始时先被洗脱。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液，以尽量减少离子源污染。在第 1.2 分钟时切换阀将液流转至质谱检测器并即刻开始数据采集。0.8 mL/min 的流速可获得较短的分析时间和再平衡时间。

浓度为 2.5 ng/mL 样品色谱峰(如图 2,上图所示)的信噪比>200:1，该结果表明 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能，可用于检测远低于 SAMHSA 规定限量浓度的 PCP（10%）。苯环利啶的疏水性极强，容易吸附在任意活性表面位点上。为避免交叉污染，我们推荐使用高效自动进样器的外部进样针端口冲洗功能，当样品浓度较高时可在进样后运行空白流动相。如果需要，洗针时间可以从 10 秒增加至 20 秒。

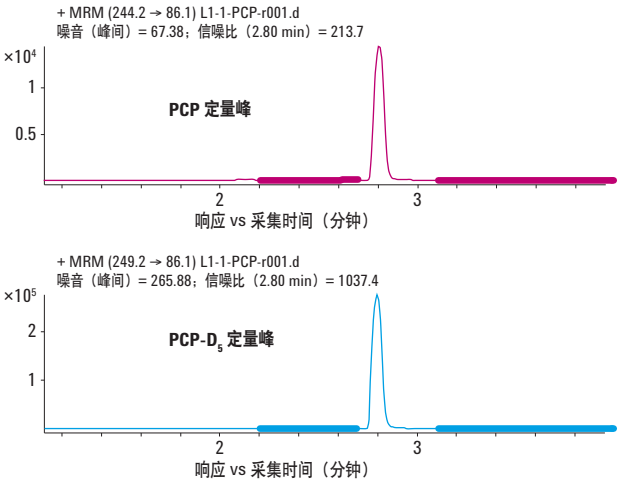


图 2. 尿液萃取物中 PCP（2.5 ng/mL）和 PCP-D5（50 ng/mL）的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱。噪音区域以加粗的形式显示

SAMHSA 准则要求分析目标化合物和内标物时必须使用一个定量离子和至少一个定性离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1)信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

图 3 为 5 个浓度水平苯环利啶的尿液萃取标准品的校准曲线。通过向阴性尿液中加入 PCP 标准品,制备浓度分别为 2.5、25、100、250 和 1000 ng/mL 的一系列校准标准溶液。添加氘代内标 PCP-D5 的浓度为 50 ng/mL。R2 > 0.999，线性关系良好，表明该方法在很宽的动态浓度范围内呈线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

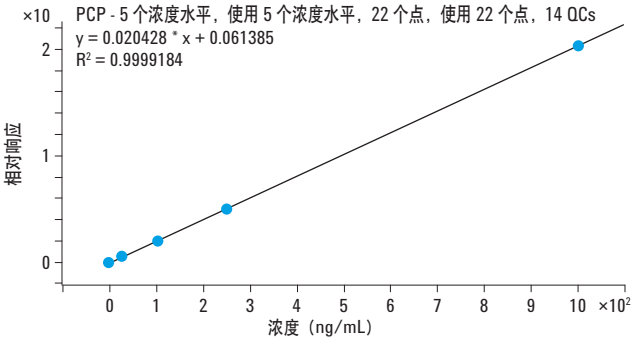


图 3. 尿液萃取物中苯环利啶的校准曲线示例。校准范围为 2.5-1000 ng/mL。线性关系良好，R^2>0.999

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
PCP	244.2	86.1	80	7
PCP	244.2	159.1	80	7
PCP	244.2	91.1	80	34
PCP-D_5	249.2	164.1	80	7
PCP-D_5	249.2	86.1	80	7

本方法采用 MRM 扫描模式，设置为常态而非动态检测，因为动态 MRM 模式对单一化合物的检测没有优势。

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的 PCP 预加到阴性尿液中，然后进行萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用同样方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入 PCP 标准品到 25 ng/mL，平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（复溶溶剂），使其浓度为 25 ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的萃取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得的。

表 2 显示了苯环利啶较高的萃取回收率（85%）、良好的准确度（93%）和精密度（0.5 %）。98%的基质效应表明只有 2%的信号由于基质干扰导致的离子抑制作用而损失（2%），从而证明了经 Plexa 吸附剂处理的萃取物拥有优异的纯净度。

表 2. 苯环利啶的分析方法评价，n=5

	%
处理效率	83
萃取回收率	85
基质效应	98
准确度	93
精密度（CV）	0.5

结论

本文所描述的固相萃取样品制备与 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全遵循 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高准确度、精密度和重现性的有法律效力的数据结果。其硬件配置与 2011 版 SAMHSA 方法中的相同均来自安捷伦。这些方法特别为 Agilent 1100 和 Agilent 1200 LC 系列的所有用户开发，这些 LC 系统的背压耐受不超过 400 bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，我们可以很容易地修改离子源参数。安捷伦科技可提供电子版的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

参考文献

1. Anon (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/

2. R. Baselt (2008) Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.

3. J. Hughes and P. Moorman (2011) Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing. Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem/cn.

4. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Analytical Chemistry, 75: 3019-3030.

5. P. Moorman and J. Hughes (2010) Phencyclidine in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS). SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5864EN.

6. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.

7. Sergi, M., Compagnone, D., Curini, R., D'Ascenzo, G., Del Carlo, M., Napoletano, S. and Risoluti, R. (2010) Micro-solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of stimulants, hallucinogens, ketamine and phencyclidine in oral fluids. Analytica Chimica Acta, 675: 132-137.

8. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller (2010) A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples II: amphetamine, methamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyethylamphetamine, phencyclidine, and (±) -11-nor-9-carboxy-Δ^9 – tetrahydrocannabinol. *Journal of Analytical Toxicology*, 34: 430-443.

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 10 日，中国印刷
5990-9626CHCN

Agilent Technologies

应用 Agilent Bond Elut Plexa 和 Agilent Poroshell 120 对尿液中的 11-nor-9-羧基-Δ^9-四氢大麻酚进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用和精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月开始生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室采用 LC/MS/MS 法确认初步药物测试结果。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生步骤，因此它远比以前应用的 GC/MS 法要简便的多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的 11-nor-9-羟基-Δ^9-四氢大麻酚的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六个简便检测方法之一，该方法主要应用安捷伦产品进行分析，例如 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂、Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.7µm 表面多孔 LC 色谱柱、Agilent 1200 Infinity LC 系统和应用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

11-nor-9-羧基-Δ^9-四氢大麻酚（THCA、“THC-酸”、THC-COOH）是四氢大麻酚（Δ^9-THC）的一个代谢产物，而四氢大麻酚是大麻中活性最高的成分。THCA 以其葡萄糖苷酸缀合物的形式，通过尿液排出，并且其排泄时间可达几周。SAMHSA 新规定的 THCA 最高限量浓度是 15 ng/mL，检测限为 10% 的限量浓度，即 1.5 ng/mL。

分析 11-nor-9-羧基-Δ^9-THC 时的样品制备需要碱水解尿样，以将葡萄糖苷酸缀合物转化为 THCA 来测定该代谢物的总量。尽管 THCA 是一种羧酸，但是为了建立一个可适用于所有 SAMHSA 监测药物预处理的单一的分析方法，我们在安捷伦吸附剂中选择了 Agilent Bond Elut Plexa PCX，一种混合型阳离子交换吸附剂来用于样品萃取。它可通过疏水作用有效地保留 THCA。

由于 Plexa 吸附剂的独特性质，本萃取方法可以获得 THCA 的高回收率萃取，且重复性好。不像其它的聚合物吸附剂，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重复性的实现，主要得益于色谱柱填料的窄粒径分布，并且不含易引起堵塞的细颗粒。

选择 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50 mm，2.7 µm 色谱柱是由于它具有高容量和极佳的分离性能。Poroshell 120 色谱柱填充了表面多孔 2.7 µm 颗粒，能提供与亚 2 µm UHPLC 色谱柱相似的柱效，但背压会减少大约 40%。因此，它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规 LC 系统上采用更高的流速来提高分辨率，同时缩短分析时间和再平衡时间。

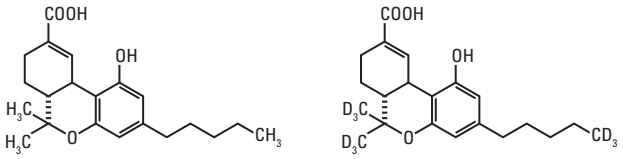
由于基本上是非极性（log P>6）的化合物，大麻素类化合物并不适合使用电喷雾电离，而通常应用 APCI 电离进行分析。然而，由于羧基的存在，在负离子模式下，THCA 比 Δ^9-THC 和 11-羟基-Δ^9-THC 更易电离。选择电喷雾离子源用于 THCA 检测也保证了使用单一质谱配置即可方便的用于所有 SAMHSA 监管药物的检测。

本方法在较小的样品进样体积（10 µL）和无预富集的条件下，限量浓度和 10% 限量浓度的样品均获得了极好的信噪比（分别大约为 100:1 和 10:1），这得益于应用了安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发，2010）采用了 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品及操作步骤。

实验部分

分析物



11-nor-9-羧基-Δ^9-THC
Log P（预测值）6.06-6.36, pKa 4.5

11-nor-9-羧基-Δ^9-THC-D_9

图 1. 11-nor-羧基-Δ^9-四氢大麻酚分析物及其结构

药物标准品购于 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（11-nor-9-羧基-Δ^9-THC）和 100 µg/mL（11-nor-9-羧基-Δ^9-THC-D9 和 11-nor-9-羧基-Δ^9-THC-葡萄糖苷酸）的甲醇溶液。

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg，3 mL（部件号 12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号 12234100）
- Agilent 截止阀（部件号 12234520）
- Agilent 硅烷化的 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号 5183-2072）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号 5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50mm，2.7 µm 色谱柱（部件号 699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机、低延迟体积配置的 1312B 二元泵、G1367E 自动进样器、G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

水解和样品预处理

1. 往 0.5 mL 尿液中加入内标，使其浓度为 50 ng/mL；推荐使用甲醇冲洗并干燥过的 12×75 mm 玻璃试管
2. 加入 100 µL 7 M KOH 溶液，涡旋
3. 在加热装置中于 60 ± 5 ºC 水解 30 分钟
4. 冷却。加入 125 µL 甲醇，涡旋
5. 加入 1.5 mL0.2 M 醋酸钠缓冲液（pH 4）
6. 用 100 µL 冰醋酸中和样品溶液，涡旋
7. 如果溶液浑浊则离心

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后使其自然滴出
2. 上样/加载上清液
3. 淋洗 1：2mL 10: 90 的乙腈: 2% 乙酸溶液淋洗 2 次
4. 淋洗 2：2mL 30: 70 的乙腈: 2% 乙酸溶液
5. 在真空（10-15 英寸汞柱）条件下，抽干 5-10 分钟
6. 用 200 µL 正己烷淋洗，在低真空（2-3 英寸汞柱）条件下抽干
7. 在高真空下干燥 3-4 分钟
8. 用 0.5mL 80: 20 的乙酸乙酯：异丙醇混合液洗脱。浸润，先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后于低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
9. 再向吸附柱中加入 1 mL 相同的洗脱剂，重复浸润–洗脱过程
10. 在 40 ºC 下蒸干
11. 使用 0.5 mL 初始流动相（30%甲醇、70% 5 mM 甲酸铵溶液）复溶

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	5 mM 甲酸铵水溶液	
流动相 B	甲醇	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	30
	1	95
	5	95
	5.1	30
停止时间	5.2 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	10 µL	
进样并洗针	用 75: 25 的甲醇: 水溶液冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数

离子检测模式	负离子
毛细管电压	4000 V
干燥气流速	11 L/min
干燥气温度	320 ºC
雾化气压力	18 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	320 ºC
喷嘴电压	0 V

MS 参数

扫描类型	MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste(){MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1：1.4min 切换阀到 MS
Delta EMV (-)	800 V

结果与讨论

大麻素类化合物易吸附在玻璃和塑料容器上是众所周知的。为使样品损失最小并且保证方法的重现性，我们强烈推荐只使用新鲜配制的样品贮备溶液和校准溶液，并且采用硅烷化或者完全用甲醇冲洗并干燥过的玻璃器皿，最终提取物复溶后应立即进行分析。

THCA 通过疏水作用保留在混合型阳离子交换吸附剂 Plexa PCX 上。100%甲醇这种常用于淋洗离子交换 SPE 柱的溶剂，并不适用于淋洗 THCA 萃取物，因为高浓度的有机溶剂会洗脱掉吸附剂

上的分析物。为使基质干扰最小化，在淋洗步骤 1 和 2 中分别使用了 10%和 30%的乙腈，用正己烷冲洗的目的也是如此。当单独使用并且量很小时（200 µL），正己烷可以洗脱掉大多数脂类，同时不会导致分析物的解吸附，因为 THCA 的疏水性很强（logP>6），它可以强烈地保留在 Plexa 颗粒的疏水中心。在洗脱步骤中推荐延长浸润过程来强化溶剂和分析物之间的相互作用，从而提高分析物的回收率。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C 18 3×50 mm，2.7 µm 色谱柱可以快速分离尿样提取物中的 THCA，并且可获得极佳的峰形（如图 2 所示）。LC 分离首先采用较低有机溶剂比例（30%）的流动相，从而使尿液中的盐类和其它极性成分在样品运行开始时先被洗脱。由于流动相梯度陡度较大，剩余的疏水干扰物质大部分先于分析物被洗脱出来，因此在目标峰洗脱出来的时候（1.96 min）就减小了基质效应。0.8 mL/min 的流速可以获得较短的分析时间和再平衡时间。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液（0 到 1.4 min），以尽量减小离子源污染。在第 1.4 分钟时切换阀将液流转至质谱检测器并立刻开始数据采集。

SAMHSA 准则要求分析目标化合物和内标物时必须使用一个定量离子和至少一个定性离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1）信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
11-nor-9-羧基-Δ^9-THC	343.2	299.2	135	18
	343.2	245.1	135	30
	343.2	191.1	135	33
11-nor-9-羧基-Δ^9-THC-D_9	352.2	308.2	145	18
	352.2	254.2	145	30
11-nor-9-羧基-Δ^9-THC 葡萄糖苷酸	519.2	343.2	160	22
	519.2	299.2	160	36

根据上述步骤对尿样处理，在阴性尿液中加入 11-nor-9-羧基-Δ^9-THC 葡萄糖苷酸至浓度为 1000 ng/mL，该样品在处理后以负离子模式检测。我们发现只出现了一个非常大的 THCA 峰，远远超过了校准最高浓度 600 ng/mL 样品的色谱峰。这表明葡萄糖苷酸通过碱水解已经完全转化为 THCA。检测 11-nor-9-羧基-Δ^9-THC 葡萄糖苷酸所用的 MS 参数列于表 1 中，供有兴趣检测水解效率的分析人员参考。

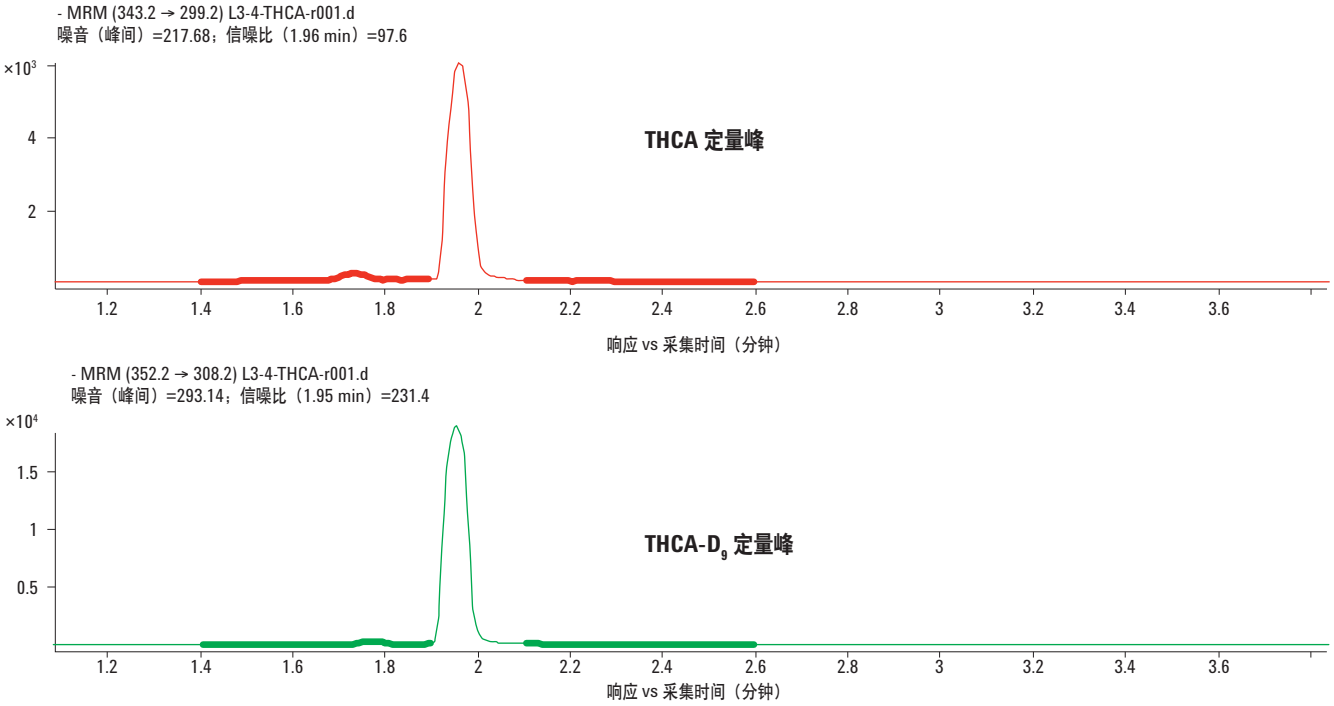


图 2. 尿液萃取物中 THCA（15 ng/mL）和 THCA-D9（50 ng/mL）的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50 mm，2.7 µm 色谱柱。噪音区域以加粗的形式显示

本方法采用 MRM 扫描模式，设置为常态而非动态检测，因为动态 MRM 模式对单一化合物的检测没有优势。

由于具有强烈的疏水性，THCA 不仅可以附着在玻璃器皿上，而且还能附着在进样器部件和液相流路管线上。为了避免交叉污染，我们建议在运行了高浓度样品后运行一个空白流动相，并且使用自动进样器 Injector Flush Pump 选项。如果需要，冲洗针的时间可以从 10 秒提高到 20 秒。

在限量浓度为 15 ng/mL 条件下 THCA 的信噪比大约为 100:1（如图 2，上图所示），表明了 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能，并且对于远小于 SAMHSA 规定限量浓度的样品（10%），也能可靠地进行检测

图 3 展示了五个浓度水平萃取尿液标准品的校准曲线。通过向阴性尿液中加入 THCA 标准品，配制浓度分别为 1.5、15、75、300 和 600 ng/mL 的一系列校准标准溶液。添加氘代内标 THCA-D9 的浓度是 50 ng/mL。$R^2 > 0.999$，线性关系良好，表明该方法在很宽的动态浓度范围内呈线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的 THCA 预加到阴性尿液中，然后进行萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用同样方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入 THCA 标准品到 15 ng/mL，平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（复溶溶剂），使其浓度为 15 ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

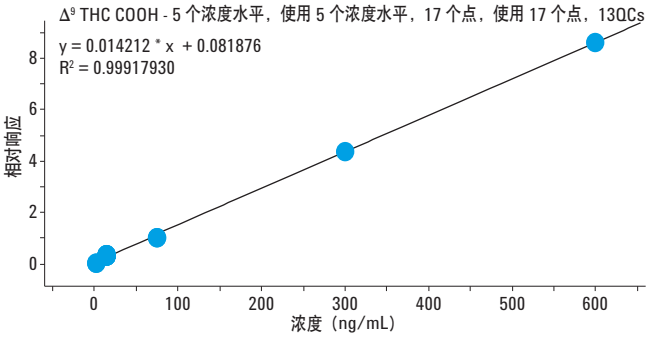


图 3. 尿液提取物中 THCA 的校准曲线示例。校准范围为 1.5 到 600 ng/mL。线性相关系数 R^2>0.999

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的提取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。

准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得的。

本法的特点是拥有较高回收率以及结果数据很高的准确度（98%）和精密度（2.2%）（如表 2 所示）。超过 100%的基质效应表明出现了离子增强作用，而非离子抑制作用。仅 13%的信号增强证明了 Plexa PCX 萃取物具有比较好的纯净度。鉴于大麻素类化合物分析的挑战性较大，73%的总处理效率可以说是非常高的。

表 2. 11-nor-羧基-Δ^9-四氢大麻酚在限量浓度水平时的分析方法评价，n=5

	%
处理效率	73
萃取回收率	65
基质效应	113
准确度	98.2
精密度（CV）	2.2

结论

本文所描述的固相萃取样品制备与 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全遵循 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高重现性的有法律效力的数据结果。THCA 分析方法的硬件配置与其它安捷伦 SAMHSA 方法相同。这些方法可以在所有型号的 Agilent 1100 和 Agilent 1200 LC 系列仪器上运行，并且这些 LC 系统的背压不超过 400 bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，我们可以很容易地修改离子源参数。安捷伦科技可提供电子版的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

参考文献

1. Anon (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/
2. R. Baselt (2008) Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. J. Hughes and P. Moorman (2011) Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing. Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem/cn.
4. P. Moorman and J. Hughes (2010) 11-nor-9-carboxy-Δ^9–tetrahydrocannabinol in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS). SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5874EN.
5. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Analytical Chemistry, 75: 3019-3030.
6. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.
7. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller (2010) A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples II: amphetamine, methamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyethylamphetamine, phencyclidine, and (±) -11-nor-9-carboxy-Δ^9 – tetrahydrocannabinol. Journal of Analytical Toxicology, 34: 430-443.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012 年 1 月 13 日，中国印刷
5990-9627CHCN

Agilent Technologies

唾液中的合成大麻素类成分

应用简报

法证与毒理学

作者

Cynthia Coulter，Margaux Garnier 和
Christine Moore
毒理学研究与开发
Immunalysis 公司，
829 Towne Center Drive，
Pomona，California 91767
美国

前言

2011 年，“合成大麻素类”或“香料”化合物中，有五种在美国被禁用。它们是：

- 1-戊基-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-018)
- 1-丁基-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-073)
- 1-[2-(4-吗啉) 乙基]-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-200)
- 5-(1,1-二甲基庚基)-2-[(1R,3S)-3-羟基环己基]-苯酚 (CP-47,497)
- 5-(1,1-二甲基辛基)-2-[(1R,3S)-3-羟基环己基]-苯酚(大麻环己醇；CP-47,497 C8 同系物)

服用者描述这些药物具有类似大麻的作用，并且这些化合物中有一些与大麻受体有很强的结合作用。11-羟基-Δ^8-四氢大麻酚的（–）-1,1-二甲基庚基取代类似物（1,1-二甲基庚基-11-羟基四氢大麻酚），代号 HU-210，据报道它曾在 2009 年美国海关与边境保护局缉获的“香料黄金”、“香料白银”和“香料钻石”中被发现。HU-210 的效力被认为超过 Δ^9-四氢大麻酚（Δ^9-THC）100 倍，并且作为一种大麻类似物已被列入控制物质。JWH-250 也是我们经常遇到的品种，故我们也把它列入研究范围。

Agilent Technologies

作为一种在路边和工作场所进行药物检测的样本，唾液检测正日益流行。它容易采集，不具有侵害性，并且可获得近期用药的信息。本文工作中使用了 Quantisal 装置来收集唾液样本，并且描述了“香料”成分的检测过程。

样本收集装置、试剂和标准品

收集唾液样本的 Quantisal 装置包括了一个可以放在嘴里的棉质采集垫。当采集到 1 mL 唾液（±10%）时，吸收体积足量指示剂会变为蓝色，然后将采集垫放入缓冲液（3 mL）中，使可用于分析的样本总体积为 4 mL（3 mL 缓冲液 + 1 mL 唾液）。用于检测的药物浓度也会相应改变。

固相萃取小柱（Bond Elut Plexa）和液相色谱柱（ZORBAX RRHT）为安捷伦科技公司产品。JWH-018、JWH-073、JWH-200、JWH-250、HU-210、CP-47497 和 CP-47497 C8 同系物，以及氘代化合物 d9-JWH-018 和 d7-JWH-073 标准品购自 Cayman Chemicals 公司。

校准溶液与质控样品的制备

将氘代内标（*d9*-JWH-018 和 *d7*-JWH-073）和未标记的药物标准品制备为浓度 100 µg/mL 的甲醇溶液。用甲醇稀释适量贮备液到 10 µg/mL 的浓度，作为工作溶液。不用时，溶液于 –20 °C 贮存。向不含药物的合成唾液中加入不同浓度的化合物，制成质控样品。每批测试样本包括不含药物的阴性样品、4 ng/mL 和 40ng/mL 浓度的阳性质控样品。

样品制备

7 个用唾液制备的校准标准溶液中，各分析物的浓度依次为 0.5、2、5、10、20、50 和 100 ng/mL，加入氘代内标（10 ng/mL）。

使用 Agilent Bond Elut Plexa（30 mg/1 mL；部件号 12109301）固相萃取小柱。

1. 活化：甲醇（0.5 mL）；0.1 M 乙酸溶液（0.1 mL）
2. 取校准工作溶液、质控样品和样品各 1 mL，分别加入乙酸溶液（0.1 M；pH 4，1 mL）
3. 上样
4. 柱淋洗：去离子水 : 冰乙酸（80 : 20；1 mL）；去离子水 : 甲醇（40 : 60；1 mL）
5. 柱干燥（5 min）
6. 洗脱酸性/中性化合物：己烷:冰乙酸（98 : 2；2 mL）
7. 干燥小柱时蒸干提取物（7 min）
8. 洗脱碱性组分到相应的试管中：乙酸乙酯 : 氢氧化铵溶液（98 : 2；2 mL）
9. 40 °C 下氮吹蒸发至干。
10. 甲醇复溶样品残渣（50 µL）；转移至自动进样瓶中；旋紧瓶盖
11. 采用 LC-MS/MS 进行分析

液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）

安捷伦科技 1200 系列液相色谱泵与 Agilent 6430 三重四级杆 LC/MS 系统联用，采用电喷雾离子化模式（ESI），根据化合物的性质选择正离子或负离子检测。

色谱柱	Agilent ZORBAX RRHT Extend C18，（2.1 × 50 mm，1.8 µm，部件号 727700-902）
柱温	60 °C
进样体积	5 µL
流动相	溶剂 A：0.2% 乙酸溶液和溶剂 B：乙腈
	时间 0 min：95% A；5% B；5 min：100% B；7 min：5% B
	运行时间 9.2 min；后运行时间 3 min
	流速 0.5 mL/min
氮气温度	350 °C
干燥气流量	10 L/min
雾化器压力	55 psi
毛细管电压	+4000 V 正离子模式
	–4000 V 负离子模式

为每种药物选择并优化了两个离子对。表1列出了转换离子对、母离子（M+1；M-1）的优化碎裂电压和子离子碎片的碰撞能量。每一个序列分析要求其定量离子和定性离子的比率应在±20%以内，以满足阳性结果的判断标准。

表1. 多反应监测（MRM）transitions；优化的碎裂电压；在10 µg/mL浓度时定量分析“香料”化合物的允许离子转换范围

化合物	离子对	碎裂电压（V）	碰撞能量（eV）	极性	定量和定性离子对比率（范围）
d9-JWH-018	351.3 > 223.4	140	20	正离子	n/a
JWH-018	342.2 > 155.1	120	20	正离子	16–24
	342.2 > 214.2	120	20		
JWH-250	336.3 > 200.2	120	12	正离子	69–104
	336.3 > 188.2	120	20		
d7-JWH-073	335.3 > 207.2	120	20	正离子	n/a
JWH-073	328.2 > 155.1	120	20	正离子	60–90
	328.2 >127.1	120	35		
JWH-200	385.3 > 155.1	140	20	正离子	54–81
	385.3 > 114.2	140	25		
CP 47497 C8	331.3 > 313.3	160	25	阴离子	70–104
	331.3 > 259.3	160	35		
CP 47497	317.3 > 299.2	160	20	阴离子	75–113
	317.3 > 245.2	160	30		
HU-210	385.3 > 367.4	120	30	阴离子	13–20
	385.3 > 281.3	120	45		

标下划线的离子对用于定量；n/a= 不可用于内标

图 1 所示 10 ng/mL 浓度时化合物一级转换离子的色谱图；各化合物一级和二级离子对的比率也是在 10 ng/mL 浓度时测定的。

采集垫的回收率

制备各化合物添加浓度均为 4 和 40 ng/mL 的六个合成唾液样品。将采集垫置于上述样品液中收集 1 mL（±10%），这可以由植入采集器的蓝色体积足量指示剂来判断。然后将采集垫转移到 Quantisal 缓冲液中，加盖并放置过夜，模拟样品运输到实验室的过程。第二天取部分样品进行分析。采集垫的回收量与绝对浓度（100%）进行对比，绝对浓度系将药物加到缓冲液中，不加入采集垫室温放置过夜，然后提取和分析得到。

各化合物的采集垫提取百分回收率在 4 和 40 ng/mL（n = 6），两个浓度时均大于 60%。最高的是 4 ng/mL 时 HU-210 的回收率，达到 86%；最低的是 40 ng/mL 时 JWH-073 的回收率，只有 61%。两个浓度水平的回收率基本上一致（表 2）。

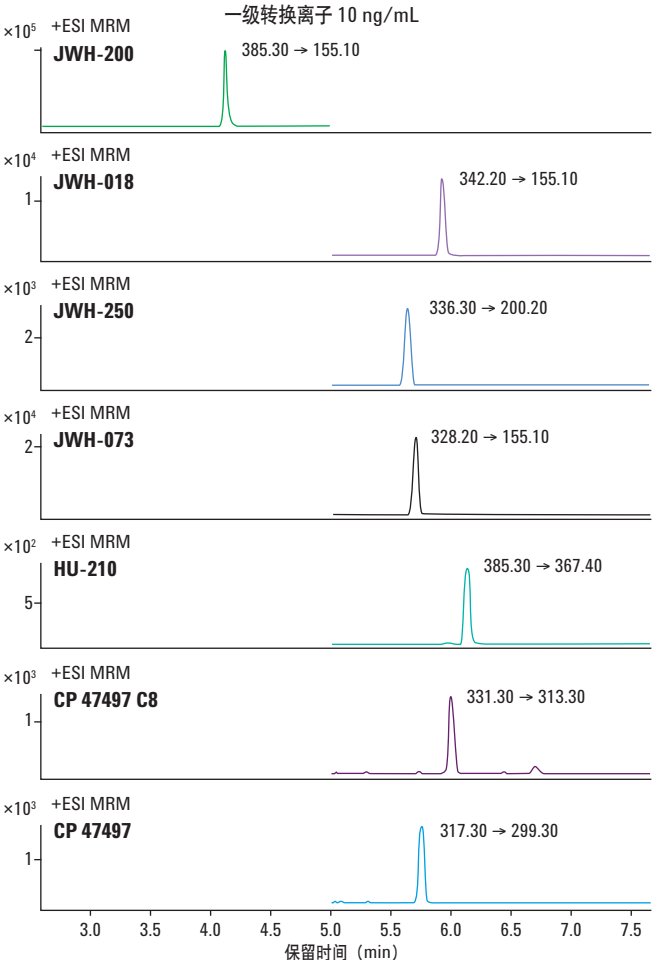


图 1. 10 ng/mL 浓度时的一级转换离子

表 2. 方法学验证数据

	JWH-018	JWH-073	JWH-200	JWH-250	CP 47497	CP 47497 C8	HU-210
LOQ（ng/mL）	0.5	0.5	0.5	2	0.5	2	5
日内误差							
4 ng/mL	3.9%	3.6%	5.0%	3.4%	4.9%	3.9%	8.6%
40 ng/mL	2.2%	2.1%	6.0%	2.0%	4.1%	4.3%	5.6%
日间误差							
4 ng/mL	8.8%	9.6%	6.2%	11%	7.7%	11%	10%
40 ng/mL	8.5%	7.9%	6.2%	11%	10%	11%	12%
采集垫回收率							
4 ng/mL	65.5%	67.4%	85.0%	66.5%	77.7%	76.0%	86.4%
40 ng/mL	70.6%	61.4%	81.4%	75.1%	71.3%	78.2%	75.7%
基质效应	-55%	-45%	-55%	-73%	-64%	-55%	-49%
处理效率	40%	51%	56%	24%	38%	45%	51%

数据分析

使用浓度范围 0.5–100 ng/mL 的线性回归分析绘制校准曲线。采用 Agilent MSD 软件计算每个浓度点中目标分析物与内标的峰面积比。数据拟合成一条线性最小二乘回归曲线，曲线未强制通过原点，且等权重。每种化合物监测了两种转换离子对用于确证分析；内标监测了一种离子对。定性离子对的比率要求在使用可接受的已知校准标准品所确定比率的 ±20% 之内。

线性和灵敏度

将溶液连续稀释到一个化合物可准确定量的最低浓度点获得方法的定量限（LOQ），即色谱峰形、保留时间（校准标准品的 2%）和定性离子对比率（± 20%）与 10 ng/mL 校准标准品测定结果比较是可以接受的。LOQ 的定量值必须在目标浓度的 ±20%以内。JWH-018、JWH-073、JWH-200 和 CP 47497 的定量限是 0.5 ng/mL；CP 47497 C8 和 JWH-250 的是 2 ng/mL；HU-210 的是 5 ng/mL（图 2）。所有化合物从 LOQ 到 100 ng/mL 浓度范围内线性关系良好（$R^2 > 0.99$；n = 5）。

基质效应

制备一个浓度为 10 ng/mL 的未经提取的药物标准品溶液，另外制备不含药物的基质提取物和阴性质控样品（提取物中只含有内标）。唾液中各化合物回收率的测定如下：首先测得浓度为 10 ng/mL 提取物（n=3）的响应 {R_{ES}}。然后提取唾液并向浓度为 10 ng/mL 的后提取物中加入药物（n=3）{R_{PES}}。通过方程式（R_{ES}/ R_{PES}）× 100 计算百分回收率。

基质效应（离子抑制）导致的响应下降通过评价未经提取的 10 ng/mL 纯药物标准品（n=3）峰面积响应来测定 {R_{NES}}。该未经提取溶液作为提取样本在相同的复溶溶剂中被分析。百分基质效应可通过公式[（R_{PES} / R_{NES}）-1] × 100 计算。总处理效率可通过公式（R_{ES} / R_{NES}）× 100 计算。

可见离子抑制效应非常明显，但是可以通过对样品进行固相萃取和使用氘代内标来限制。

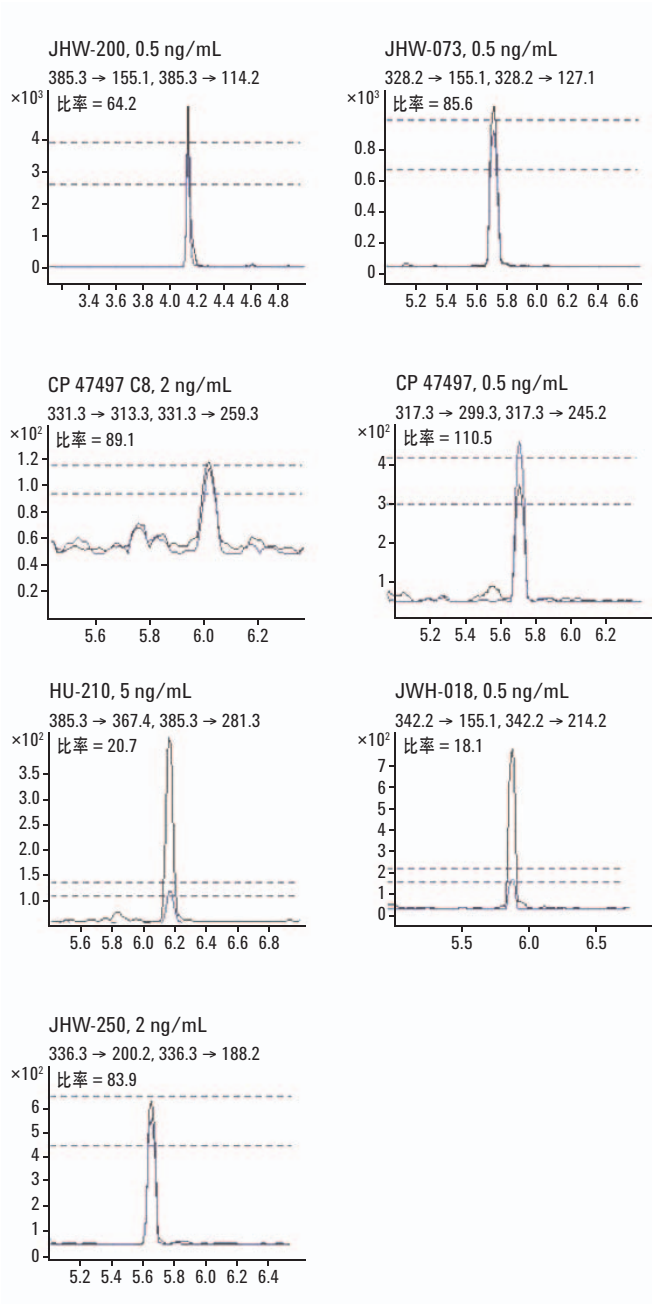


图 2. ±20% 比率的 LOQ 浓度

选择性

使用 Quantisal 装置采集了五个不含药物的唾液样本。各样本取适量按照上述步骤进行提取和分析，以考察内源性化合物或者运输用缓冲液带来的潜在干扰。

另外，在剩余的上述不含药物的唾液中加入常见的滥用药物至浓度为 2000 ng/mL，按照上述步骤提取、分析。

THC	阿米替林
THC-COOH	环苯扎林
11-OH-THC	丙咪嗪
大麻酚	度硫平
大麻二酚	多塞平
可卡因	氟西汀
苯甲酰爱康宁	舍曲林
去甲古柯碱	曲米帕明
可卡乙碱	普罗替林
可待因	氯丙嗪
吗啡	氯米帕明
6-AM	去甲替林
6-AC	帕罗西汀
羟考酮	地昔帕明
羟吗啡酮	溴西泮
氢可酮	阿普唑仑
氢吗啡酮	氯硝西泮
苯丙胺	劳拉西泮
去氧麻黄碱	奥沙西泮
MDMA	地西泮
MDA	咪达唑仑
MDEA	氟西泮
芬特明	氟硝西泮
芬太尼	去甲西泮
苯环利啶	三唑仑
曲马多	替马西泮
卡立普多	硝西泮
甲丙氨酯	氯氮卓
西酞普兰	美沙酮
文拉法辛	

不含药物提取物中未发现内源性干扰；也未发现来自常见药物的外源性干扰，如可在高浓度下被分析的 THC 及其主要代谢物。

误差

制备同时加标所有化合物的浓度为 4 ng/mL 和 40 ng/mL 的样品。每个浓度的样品连续五天（n=6；日内不精密度）按照上述步骤操作（n=30；日间不精密度）进行分析。两个浓度的所有药物检测日内误差小于 9%，日间误差小于 12%（表 2）。

真实样品

样本采自两名当地志愿者，他们曾购买了这些当时在美国仍合法的化合物。受试对象 1 吸食了“Blueberry Posh”，受试对象 2 吸食了“黑曼巴”。使用 Quantisal 唾液收集装置，采集吸食前，以及吸食后不同时间点的样本。采集受试对象 1 吸食后 20 min、40 min、1 h、2 h 和 12 h 的样本；采集受试对象 2 吸食后 20 min、40 min、1 h、5 h 和 12 h 的样本。这些样本在采集后的第二天进行分析，然后剩余样本在 4 °C 贮存一个月后用另一种方法重新分析。一年后，采用相同的程序再测定一遍。当然，现在已经没有可能获得真实样本了，因为现在拥有这些化合物已属非法行为。

两个制备物中检测到的主要活性的化合物是 JWH-018。4 °C 贮存一个月后对样本重新分析，发现目标化合物极其稳定，两次检测浓度几乎完全相同。4 °C 贮存一年后对样本重新分析，发现受试对象 1 的检测结果与一年前基本相同；受试对象 2 的样品检测后发现，那些原来浓度就很低的化合物，现在更低了（见图 3）。

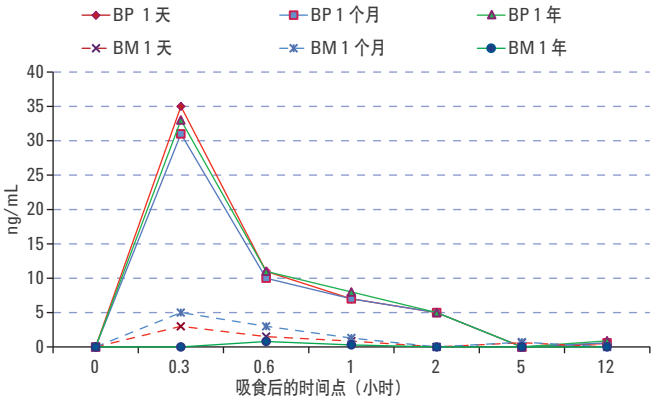


图 3. 4 °C 贮存的真实样本的稳定性

图 4 为提取离子色谱图，显示了吸食 40 min 后样本（受试对象 1）的离子对和围绕定性离子对强度 ±20% 的可接受范围；JWH-018 的浓度是 11 ng/mL。

结论

本文首次报道了唾液中多种“香料”化合物的同时测定。分析步骤适用于采用 Quantisal 装置收集的含有合成大麻素类成分样本的分析，样本中两种浓度采集垫的提取回收率均大于 60%。跟踪两种不同品牌草本产品的单次吸食过程，发现在单次吸食 20 min 后唾液中检测到最高浓度的 JWH-018。即使一年之后，单次吸食“Blueberry Posh”12 h 后的唾液样本中仍可检测到 JWH-018。

更多信息

这些数据代表典型结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

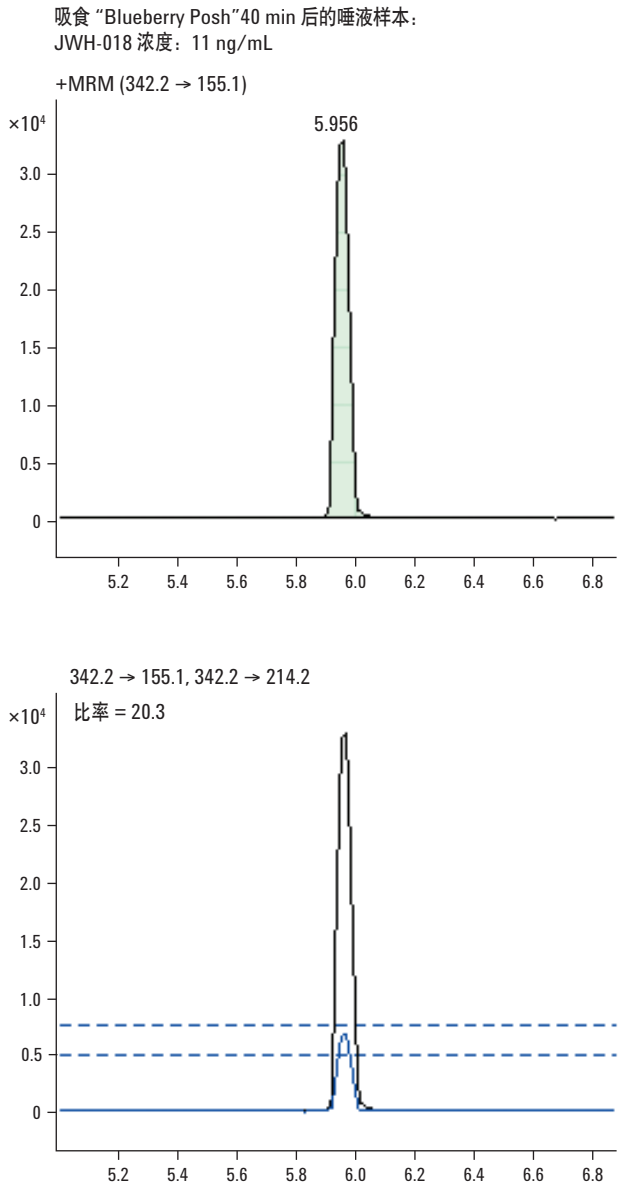


图 4. 受试对象 1 吸食 40 min 后的唾液样本；JWH-018 = 11ng/mL

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 17 日，中国印刷
5990-9679CHCN

Agilent Technologies

采用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 和 Agilent Poroshell 120 色谱柱对全血中的丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡进行 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医学与药物测试

作者

Irina Dioumaeva
安捷伦科技有限公司

摘要

法医和疼痛科实验室进行全血中丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的检测时，需要一种能在浓度低于 1 ng/mL 的水平内可靠检测这些化合物的分析方法。一种简单的样品净化步骤，结合使用离子对 468.2→55.1 和 414.2→83.1 的 LC/MS/MS 方法，可实现两种分析物的检测限（LOD）低于 0.1 ng/mL。每种分析物校正曲线的线性范围为 0.2 到 20 ng/mL，其 R^2 等于或大于 0.999。采用安捷伦新一代产品分析可获得更高的检测灵敏度。这些产品包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂、Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.7 µm 表面多孔填料 LC 柱、Agilent 1200 Infinity LC 系统、以及配备了安捷伦喷射流技术（AJST）增强型电喷雾离子源的 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 系统。

Agilent Technologies

引言

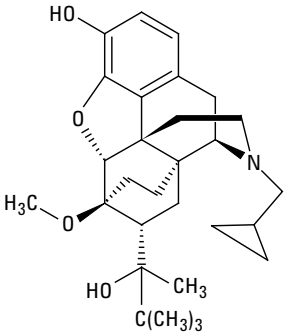
丁丙诺啡是一种半合成的鸦片样药物，用于治疗慢性疼痛，以及作为美沙酮的替代品治疗阿片成瘾。作为镇痛剂，丁丙诺啡的效果大约是吗啡的 25 到 40 倍。丁丙诺啡的结构与吗啡相似，但疏水性更强（见图 1）。丁丙诺啡在肝脏中存在 N-脱烷基化反应，产生其主要活性代谢物——去甲丁丙诺啡。丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡在血液中的浓度非常相近，50% 以上病例中的浓度低于 1 ng/mL（Selden 等，2011），给分析人员的检验带来了极大的挑战。此外，由于这些分析物分子结构稳定性强，碰撞诱导裂解产生的碎片量少，因此对这些化合物进行 MS/MS 分析很困难。为了实现检测灵敏度低于 1 ng/mL，检测这些化合物的分析方法不仅要有出色的 MS 性能，还要有一个回收率高、离子抑制低的有效样品净化程序。我们使用 SPE 处理的全血提取物洁净度高，较容易地实现了检测限低于 0.1 ng/mL。与其它聚合物吸附剂不同，所有 Agilent Bond Elut Plexa 系列产品的颗粒均具有不含氨基的羟基化表面，消除了对蛋白质的吸附，从而获得了最低的离子抑制和最高的检测灵敏度。又由于填料粒径分布窄且没有粉末造成堵塞，还实现了高流速和良好的重现性。

利用该方法可实现分析物的良好分离和极佳的峰形，这是采用 Agilent Poroshell 120 系列色谱柱进行分析的特色。采用表面多孔的 2.7 µm 填料，这些色谱柱具有与亚 2 µm UHPLC 色谱柱相似的柱效，但背压却降低了约 40%。这就允许用户甚至可以使用 400 bar LC 系统来提高分离度，并且通过使用更高的流速来缩短分析和再平衡时间。

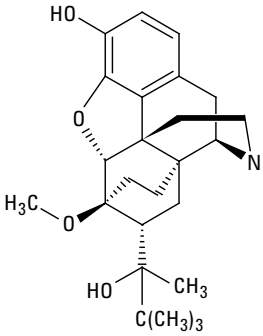
本文定量分析使用的经鉴定具有最高丰度的新离子对是 468.2 > 55.1（丁丙诺啡）和 414.2 > 83.1（去甲丁丙诺啡）。该方法仅需 0.5 mL 血样，采用 10 µL 较低的进样体积和提取时 5 倍预浓缩，即可在 0.2 ng/mL 浓度时实现良好的信噪比：丁丙诺啡为 84 : 1，去甲丁丙诺啡为 20 : 1（见图 2）。

实验部分

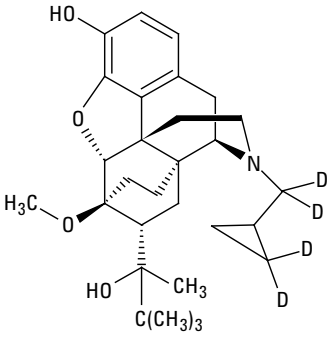
分析物



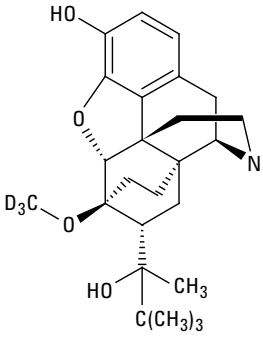
丁丙诺啡
$C_{29}H_{41}NO_4$ M.W. 467.65
Log P 4.9-5.0
pKa 8.3



去甲丁丙诺啡
$C_{25}H_{35}NO_4$ M.W. 413.55
Log P 3.4-3.8



丁丙诺啡-D_4
$C_{29}H_{37}D_4NO_4$ M.W. 471.62



去甲丁丙诺啡-D_3
$C_{25}H_{32}D_3NO_4$ M.W. 416.53

图 1. 分析物丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡及其结构。log P 和 pKa 值来自 SRC 和 PubChem

药物标准品为 1 mg/mL （丁丙诺啡、去甲丁丙诺啡）和 100 µg/mL （丁丙诺啡-D_4 和 去甲丁丙诺啡-D_3）的甲醇溶液，购自 Cerilliant 公司。

材料和仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱，30 mg，3 mL（部件号 12108303）
- 安捷伦真空多管装置 VacElut 20（部件号 12234100）
- 安捷伦活塞阀（部件号 12234520）
- 安捷伦硅烷化自动进样瓶，2 mL（部件号 5183-2072）
- 安捷伦样品瓶内插管，250 µL， 脱活玻璃，聚合物底座（部件号 5181-8872）
- 安捷伦螺旋盖，用于 AS 样品瓶（部件号 5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18，3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱（部件号 699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微量脱气机、1312B 低延迟体积二元泵、G1367E 自动进样器、G1330B 柱温箱）

MS

- Agilent 6460A 三重四极杆 LC/MS 系统，配备 AJST 电喷雾离子源

样品制备

预处理

1. 将适量 ISTD 加入0.5 mL 血样中，使浓度为 10 ng/mL，或采用 0.1 M 磷酸盐缓冲液（pH 6.0）配制 10 ng/mL 的 ISTD 溶液，并在每份血样中加入 0.5 mL 此内标缓冲液。推荐使用甲醇清洗并晾干的 12 × 75 mm 玻璃管
2. 加入 ISTD 后，加入 2 至 2.5 mL 磷酸盐缓冲液（血样至少被稀释了 5 倍）
3. 涡旋后离心，使沉淀完全

萃取

1. 采用 0.5 mL 甲醇活化 Bond Elut Plexa PCX 小柱浸泡，然后使其自然滴落
2. 上样/使用 Pasteur 玻璃吸量管吸取上清液
3. 淋洗 1：2 × 2 mL 2% 甲酸溶液
4. 淋洗 2：3 mL 甲醇/2% 甲酸溶液（70 : 30）
5. 真空干燥 5-10 min（10-15 in Hg）
6. 用 1.5 mL 乙酸乙酯/异丙醇/氨水（80/20/5）混合液洗脱。在洗脱即将开始前加入氨水。将洗脱液分成两等份，依次浸泡吸附剂。关闭活塞阀浸泡约 0.5 min 后，打开活塞阀让洗脱液在重力作用下滴入收集瓶中。当洗脱液不再滴落时，使用低真空抽取吸附剂小孔中的洗脱液
7. 45 °C 下氮气吹干
8. 用 0.1 mL 初始流动相（15% 甲醇、85% 水、0.1% 甲酸）复溶残渣，涡旋后转移至带聚合物底座的样品瓶内插管中

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1% 甲酸水溶液	
流动相 B	0.1% 甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（min）	% B
	0.0	15
	2.0	70
	2.1	95
	5.5	95
	5.51	15
停止时间	5.6 min	
后运行时间	2 min	
最大泵压	400 bar	
进样体积	10 µL	
带针头清洗的进样		
针头清洗	用甲醇-水（95 : 5）冲洗针座 10 s	
禁止重叠进样模式		
无自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数

离子化模式	正离子
毛细管电压	2800 V
干燥气流量	10 L/min
干燥气温度	350 °C
雾化气压力	35 psi
鞘气流量	12 L/min
鞘气温度	350 °C
喷嘴电压	0 V

MS 参数

扫描方式	MRM
预运行程序	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.8 min - 转换阀至 MS
EMV (+) 增益	400 V

表 1 展示了目标化合物及其同位素内标物 MRM transitions 的定量离子和定性子离子。

表 1.　　MRM transitions

化合物名称	母离子	MS1 的分辨率	子离子	MS2 的分辨率	碎裂电压	碰撞能量
丁丙诺啡	468.3	Unit	55.1	Wide	200	62
丁丙诺啡	468.3	Unit	396.2	Wide	200	45
丁丙诺啡-D_4	472.3	Unit	59.1	Wide	200	62
丁丙诺啡-D_4	472.3	Unit	400.2	Wide	200	45
去甲丁丙诺啡	414.3	Unit	83.1	Wide	188	60
去甲丁丙诺啡	414.3	Unit	57.1	Wide	188	50
去甲丁丙诺啡-D_3	417.3	Unit	83.1	Wide	188	60
去甲丁丙诺啡-D_3	417.3	Unit	57.1	Wide	188	50

结果与讨论

在低 pH 值条件下，丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的叔胺官能团被质子化，通过疏水作用和强阳离子交换作用，它们在 Agilent Bond Elut Plexa PCX 聚合物吸附剂上获得较强的保留。

使用 100% 甲醇淋洗会从 SPE 柱上冲下部分分析物而造成损失。有效去除基质干扰物而又不损失样品的最佳淋洗条件为甲醇-2% 甲酸溶液（70 : 30）。在有机洗脱液中加入强碱以破坏分析物和强阳离子交换吸附剂之间的离子相互作用。在样品洗脱开始前添加 5% 氨水到乙酸乙酯：异丙醇混合洗脱液（80 : 20）中，丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡可以得到最佳的回收率。推荐使用两步洗脱法并结合浸泡步骤，以增强溶剂-分析物的相互作用并提高样品回收率。

由于疏水性强，丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡可能粘附到玻璃器皿、LC 管路和进样器部件中，这也是为什么我们推荐在 LC 方法中使用 95% 甲醇冲洗色谱柱和使用甲醇-水（95 : 5）冲洗针座的原因。采用去活处理的样品瓶/内插管和甲醇清洗并晾干的玻璃器皿（STD 和 ISTD 稀释液用的管和瓶子）也确保了结果的良好重现性。

LC 分离开始时特意以相对较低比例的有机相（15%）进行洗脱，以使血样中的盐和其它极性化合物在样品运行初期即被洗脱下来。0.8 mL/min 的流速使分析时间和再平衡时间都较短。每次样品运行均将开始部分的洗脱液（0 到 1.8 min）导入废液中，以最大程度地降低对离子源的污染。1.8 min 时开始数据采集，即转换阀切换后立即开始。

图 2 为丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡在 0.2 ng/mL LOQ 时及其氘代内标物在 10 ng/mL 时的色谱图。

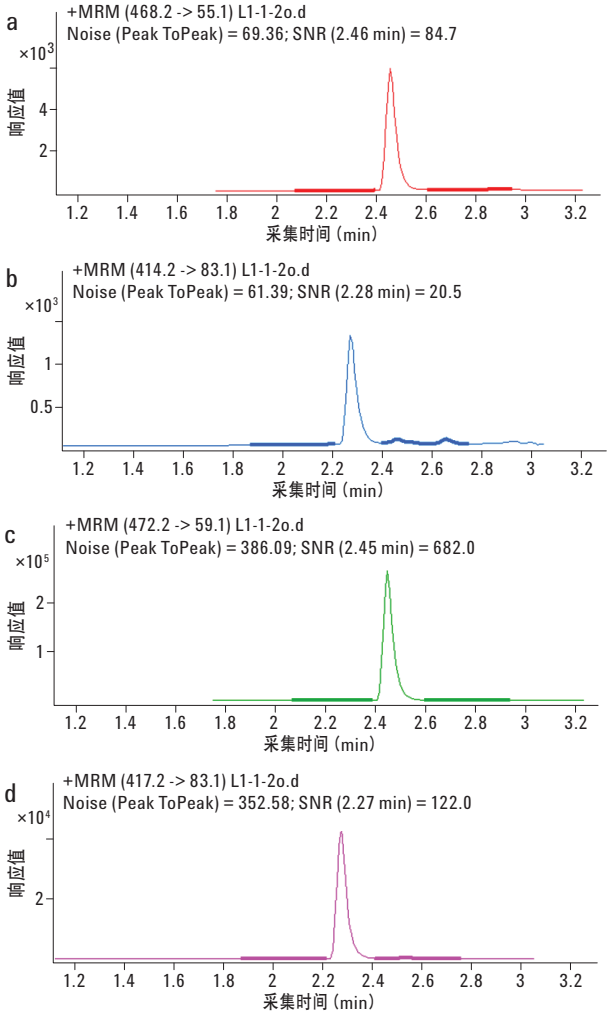


图 2.　　MRM 萃取离子色谱图：a – 丁丙诺啡，b – 去甲丁丙诺啡（均为 0.2 ng/mL），c – 丁丙诺啡-D_4，d – 去甲丁丙诺啡-D_3（均为 10 ng/mL）。全血提取物经 Agilent Bond Elut Plexa PCX 处理，采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱分析。噪音区域加粗显示

丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡这两种化合物分子离子的高稳定性给 MS/MS 检测造成了困难，这导致许多研究人员采用 SIM 模式对它们进行定量（Scislowski et al，2005；Concheiro et al，2009），或者在 SRM 模式下采用较高的碰撞能量（无碎片）监测分子离子的转换离子（Kronstrand et al，2003；Selden et al，2011）。与选择性更强的母离子-子离子对定量相比，这种方法可靠性差。并且，这种方法有较低的信噪比，从而具有较高的 LLOQ。利用 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 系统（表 1）在高碰撞能量水平下获得了一种新的稳定碎片类型，两种分析物在 LLOQ 为 0.2 ng/mL 时均可实现可靠定量。丁丙诺啡丰度最高的碎片是 *m/z* 55.1 的甲基环丙基（C_4H_7）基团。它通过丁丙诺啡-D_4 的 *m/z* 59.1 碎片得以鉴定确认。去甲丁丙诺啡丰度最高的碎片子离子（*m/z* 83.1）可能来自母离子的侧支链，包括叔丁基基团 $(CH_3)_3C$。与最佳碰撞能量下获得的最常用碎片子离子相比，丁丙诺啡的 *m/z* 55.1 子离子的丰度比 *m/z* 396.2 高 8 倍，而去甲丁丙诺啡 *m/z* 83.1 子离子的丰度比 *m/z* 101.1 高 2 倍。

表 1 中列出的 MRM transitions 是两种目标化合物及其氘代 ISTD 的一个定量和一个定性子离子。Agilent MassHunter 软件自动计算定性离子的比率，突出显示那些超出可接受范围的离子。

常态或动态 MRM 采集模式在这种方法下均可使用。

LLOQ 水平为 0.2 ng/mL 时的信噪比分别为丁丙诺啡 84 : 1，去甲丁丙诺啡 20 : 1（图 2，a 和 b）。这证明了本样品净化程序的高效性和 6460 三重四极杆质谱出色的检测灵敏度，从而能够实现在低于 0.1 ng/mL 的 LOD 下检测这些分析物。

图 3 展示了 5 种浓度全血标样中提取的丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的典型的校正曲线。校正标样由加标分析物至全血中制得，使浓度分别为 0.2、1、5、10 和 20 ng/mL。添加氘代内标物的浓度为 10 ng/mL。每条曲线出色的线性拟合（$R^2 > 0.999$）证明了本方法线性良好。未采用加权处理，曲线拟合中包括了起点数据。

表 2 展示了五个全血样品的回收率（准确度）和精密度（CV，或 RSD）数据，其每个分析物的加标浓度均为 1 ng/mL。通过比对加标混合标样获得的校正曲线进行定量分析（图 3）。

表 2.　每个分析物在浓度为 1 ng/mL 时进行的方法验证，n = 5

	准确度（%）	CV %
丁丙诺啡	94.2	0.6
去甲丁丙诺啡	103	0.2

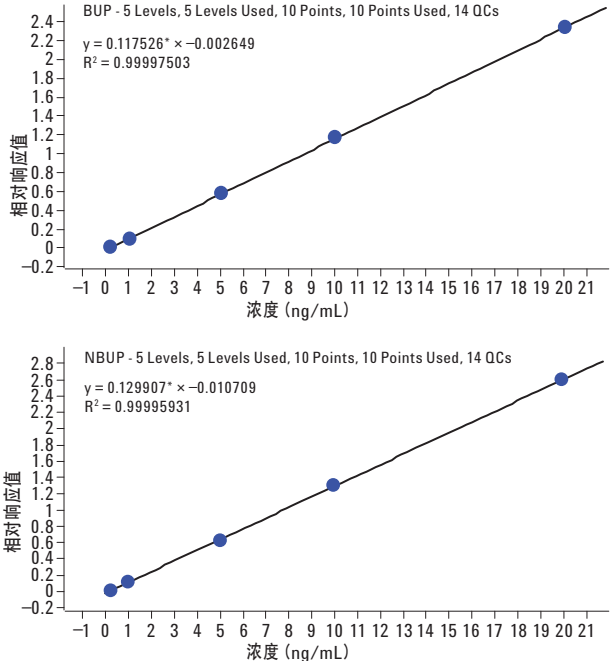


图 3.　全血提取物中丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的典型校正曲线。浓度范围 0.2 至 20 ng/mL。线性拟合 R^2>0.999

结论

本文介绍了一种简单的、固相萃取结合 LC/MS/MS 检测的方法，实现了全血中浓度低于 0.2 ng/mL 的丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的定量分析。本方法专为安捷伦 1100 和 1200 LC 系列仪器的用户开发，因为其 LC 系统的背压不能超过 400 bar。如采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统仪器运行本方法，离子源参数可以很容易修改。由于样品提取物的净化度高，同时使用经高丰度碎片子离子重新鉴定的离子转换通道的耐用的 MS 检测，使本方法获得了较低的检测限。

参考文献

Baselt, R. (2008) Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.

Concheiro, M., Shakleya, D. M. and Huestis, M. A. (2009) Simultaneous quantification of buprenorphine, norbuprenorphine, buprenorphine-glucuronide and norbuprenorphine-glucuronide in human umbilical cord by liquid chromatography-tandem mass spectrometry Forensic Science International, 188 (1-3): 144–151.

Kronstrand, R., Selden, T. G. and Josefsson, M. (2003) Analysis of buprenorphine, norbuprenorphine, and their glucuronides in urine by liquid chromatography–mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 27: 464–470.

Miller, E. I., Torrance, H. J. and Oliver, J. S. (2006) Validation of the Immunalysis microplate ELISA for the detection of buprenorphine and its metabolite norbuprenorphine in urine. Journal of Analytical Toxicology, 30:115–119.

Moody, D. E., Slawson, M. H., Strain, E. C., Laycock, J. D., Spanbauer, A. C. and Foltz, R. L. (2002) A liquid chromatographic–electrospray ionization-tandem mass spectrometric method for determination of buprenorphine, its metabolite, norbuprenorphine, and a coformulant, naloxone, that is suitable for in vivo and in vitro metabolism studies. Analytical Biochemistry, 306: 31–39.

Moore, C., Coulter, C. and Crompton, K.（2007）液相色谱/三重四极杆质谱测定尿样中的丁丙诺啡、去甲丁丙诺啡及其葡糖苷酸产物。安捷伦应用报告 5989-7072CHCN。安捷伦科技有限公司。

Øiestad, E. L., Johansen, U., Øiestad, A. M. L. and Christophersen, A. S. (2011) Drug screening of whole blood by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 35: 280-293.

Scislowski, M., Piekoszewski, W., Kamenczak, A. and Florek, E. (2005) Simultaneous determination of buprenorphine and norbuprenorphine in serum by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 29: 249–253.

Selden, T., Roman, M., Druid, H. and Kronstrand, R. (2011) LC–MS–MS analysis of buprenorphine and norbuprenorphine in whole blood from suspected drug users. Forensic Science International, 209: 113–119.

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们网站：www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012 年 2 月 28 日，中国印刷
5990-9930CHCN

Agilent Technologies

快速、稳定、灵敏地测定头发中的 11-羟基-Δ^9-四氢大麻酚-9-羧酸（THCA）

应用报告

法医/兴奋剂控制

作者

David Engelhart
Omega Labs Inc.
摩加多尔, 俄亥俄州 44260
美国

Fred Feyerherm
Stephan Baumann
Bernhard Rothweiler
安捷伦科技公司
圣克拉拉，加利福尼亚州 95051
美国

摘要

本文介绍了一种使用色谱柱切换和反吹技术开发的头发中 THCA 大麻代谢物的快速、稳定的测定方法，运行时间和循环时间分别为 7 min 和 9 min。方法检出限为 0.002 pg/mg，定量限为 0.01 pg/mg。

前言

通过检测头发来监测滥用药物已有 50 多年的历史了，很大程度上是由于其能够监测很长时间内的用药情况，与其他生物基体相比，很多药物能够在头发中得到良好保存。头发检测在犯罪调查中广泛使用，比如监视假释犯的戒毒情况，查证吸毒史，识别吸毒诱导型性侵犯等。头发药检还普遍用于筛查和监测下列人群的涉毒情况，如公司雇员、参与药物治疗的患者和涉及孩子抚养权的各方。工作场所执行程序即包括头发药检，其优点为样品易于采集、难于造假以及可监测毒品摄入时间更长。

大麻是法医和毒品筛查中经常检测的药物之一。其母体化合物四氢大麻酚(THC)在头发中含量较高，但是为消除吸抽大麻引起的环境空气污染，经常选取其代谢产物 11-羟基-Δ^9-四氢大麻酚-9-羧酸（THCA）作为检测物。美国药物滥用和精神健康服务管理局(SAMHSA)尚未通过相应的工作场所头发检测标准，但建议的nor-9-羰基-Δ_9-四氢大麻酚指导限值 0.05 pg/（mg 头发），这一限值将成为该监管机构进一步研究和分析的主题。毛发测试学会建议的 THCA 定量限为 LOQ ≤ 0.2 pg/（mg 头发）。

Agilent Technologies

该应用报告介绍了一种使用 Agilent 7890A 气相色谱联用 7000B 三重串联四级杆质谱系统开发的测定头发中 THC 代谢物的方法。该方法使用二维气相色谱和负离子化学电离源（CI）MS/MS，在多反应监测（MRM）模式下（也称为 SRM，选择性反应监测模式）获得了优异的灵敏度和快速的检测速度。该方法改良于之前的报道过的 GC/MSD 方法【1】，充分利用了三重串联四级杆质谱的低化学背景和高灵敏度的优势。利用反吹提高了方法的耐用性，低热容（LTM）色谱柱模块加速了色谱分析过程，使运行时间仅为 7 min，循环时间也仅为 9 min。建立在三重串联四级杆质谱上的 MRM MS/MS 分析表现出了卓越的灵敏度，LOD 和 LOQ 分别仅为 0.002 pg/mg 和 0.01 pg/mg。

实验部分

标准和试剂

使用三-氘代 THCA 作为内标物(浓度为 100 µg/mL 的甲醇溶液)，无同位素标记的 THCA（浓度为 100 µg/mL 的甲醇溶液）购自 Cerilliant 公司, (Round Rock, TX)。头发中的内标浓度为 0.05 pg/mg。

甲醇、乙腈、甲苯、乙酸乙酯、正己烷、冰醋酸和二氯甲烷购自 Spectrum Chemicals 公司(Gardena, CA)。所有溶剂均为 HPLC 级或更高，所有化学试剂均为ACS 级。Bond Elut Certify I 固相萃取柱(130 mg)购自安捷伦科技公司(Walnut Creek, CA)，或者使用 Clean Screen ZSTHC02 萃取柱(200 mg) ，购自 United Chemical Technologies, Inc. (Bristol, PA)。衍生化试剂全氟丙酸酐(PFPA)和六氟异丙醇(HFIP)分别购自 Sigma–Aldrich 公司 (St. Louis, MO) 和 Campbell Science 公司 (Rockton, IL)。

仪器

实验使用配备多模式进样口（MMI）和 LTM 系统的安捷伦 7890N 气相色谱及安捷伦 7000B 三重串联四级杆质谱联用系统。使用三通管 Purged Ultimate Union 连接预柱实现反吹和 Deans Switch 连接两个低热容（LTM）色谱柱，实现二维色谱模式运行（图 1）。仪器条件列于表1。

表 1. 安捷伦 7890N/7000B 气相色谱和三重串联四级杆质谱条件

GC 运行条件	
预柱	1 m × 0.15 mm × 1.2 µm DB-1 (部件号 12A-1015)
分析柱	
色谱柱 1	15 m × 0.25 mm × 0.25 µm DB-1ms LTM 色谱柱模块 (部件号 122-0112LTM)
色谱柱 2	15 m × 0.25 mm × 0.25 µm DB-17ms LTM 色谱柱模块 (部件号 122-4712LTM)
进样体积	2 µL
进样口温度	250 °C 恒温
进样口模式	0.75 分钟脉冲不分流，35 psi
柱箱温度	
GC 柱箱温度	250 °C(恒温)保持 7 min
色谱柱 1 LTM 模块	100 °C 保持 50 s
	从 100°C 以 200 °C/min 速率升至 210 °C
	从 210 °C 以 10°C/min 速率升至267 °C
	267 °C 保持 2 min
色谱柱 2 LTM 模块	100 °C 保持 324 s
	从 100 °C 以 200 °C/min 速率升至 230 °C
	从 230 °C 以 10 °C/min 速率升至 240 °C
	240 °C 保持 2 min
载气	氦气，恒压 预柱: 1 psi;色谱柱 1: 26.6 psi; 色谱柱 2: 19.6 psi
传输管线温度	300 °C
质谱条件	
调谐	自动调谐
EMV Delta	1200 V
数据采集参数	NCI; 多反应监测模式 (MRM)
试剂气体	氨， 35%
碰撞气体	氩气， 恒流， 0.9 mL/min
淬灭气体	氦气， 恒流，0.5 mL/min
溶剂延迟	6.2 min
MS 温度	离子源 150 °C; 四级杆 150 °C

样品制备

样品按前述方法制备【2】。将校准样，质控样或 20 mg 头发样本称量至硅烷化玻璃试管中，用 1.5 ml 二氯甲烷进行清洗。弃去洗液，将头发晾干。按 0.05 pg/mg 的浓度向头发样本中加入 THCA-d3 内标物。分别向头发中按 0.002, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 和 0.5 pg/mg 的比例加入无同位素标记的 THCA 校准标准系列。

向试管中加入 0.5 mL 去离子水和 0.5 mL 2N 的 NaOH，在 75 °C 的温度下加热 15 min。样品冷却后在 2500 rpm 速度下离心 15 min。将上清液倒入到预先装有 1 ml 冰醋酸和 3 ml 1M 冰醋酸和 2 ml 0.1M 醋酸钠组成的缓冲体系中(pH 4)。加盖混匀。

SPE 柱预先经正己烷/乙酸乙酯(75:25, v/v; 2 mL)，3 ml 甲醇，3 ml 去离子水和 1ml 0.1M 盐酸进行活化处理。将酸化的样品加到 SPE 柱上，待干。然后用 2-3 ml 去离子水淋洗 SPE 柱，静置 5 min。再用 0.1 M 盐酸/乙腈(70:30 v/v; 3 mL)继续淋洗 SPE 柱，在 30 psi 下静置 10 min。最后用正己烷/乙酸乙酯(75:25 v/v; 3 mL)洗脱，将 THCA 洗脱到硅烷化玻璃试管中。

40 °C 下将洗提液氮吹至干。使用 PFPA (70 µL) 和 FIP (30 µL)进行衍生化。将混合液转移到自动进样器上装有玻璃内插管和密封盖的样品瓶上。将样品瓶在 80 °C 加热 20 min，在室温下静置 10 min。在真空腔中将洗提液蒸发至干。最后用甲苯(50 µL)复溶，然后用 GC/MS 分析。

分析参数

安捷伦三重串联四极杆 GC/MS 的参数如表 2 所示。

表 2. Agilent 7000 B 三重串联四极杆 GC/MS 的分析参数

化合物	RT (min)	MRM	驻留时间 (ms)	碰撞能量 (EV)
THCA*	6.714	620→492	50	5
		620→383	50	5
THCA-d3	6.710	623→495	20	5
		623→386	20	5

*11—羟基—Δ^9—四氢大麻酚—9—羧酸

结果

使用中心切割的二维气相色谱

使用双色谱柱分离背景和目标化合物作为一项完善的技术广泛用于实现基体干扰和目标物的优异分离。一旦被分析物的保留时间在第一根色谱柱上得到确认，气路转换开关（Deans Switch）就会在那个时间开启并将气流切换到第二根色谱柱，并在短时间后关闭。这种切换可使第一根色谱柱上的流出物形成窄的中心切割“窗口”，在保证包含被分析物的同时，确保流入背景最小化，以在第二根色谱柱上实现进一步分离（图 1）。应使两根色谱柱的固定相尽量不同，以使双柱配置的作用达到最大化。

优异的稳定性和分析速度

反吹功能和低热容(LTM)色谱柱模块相结合使该方法与传统单色谱柱方法相比性能更稳定，分析速度更快。三个相互独立的程序压力控制区可与三个相互独立的程序温度控制区结合（图 1）使用。预柱和第一根 LTM 色谱柱装填非极性 DB-1ms 固定相，第二根 LTM 色谱柱装填极性较强的 DB-17ms 固定相。中心切割视窗宽度仅为 0.2 min (5.5 到 5.7 min)。

一种独一无二的系统，用于头发中 THCA 的高效快速检测

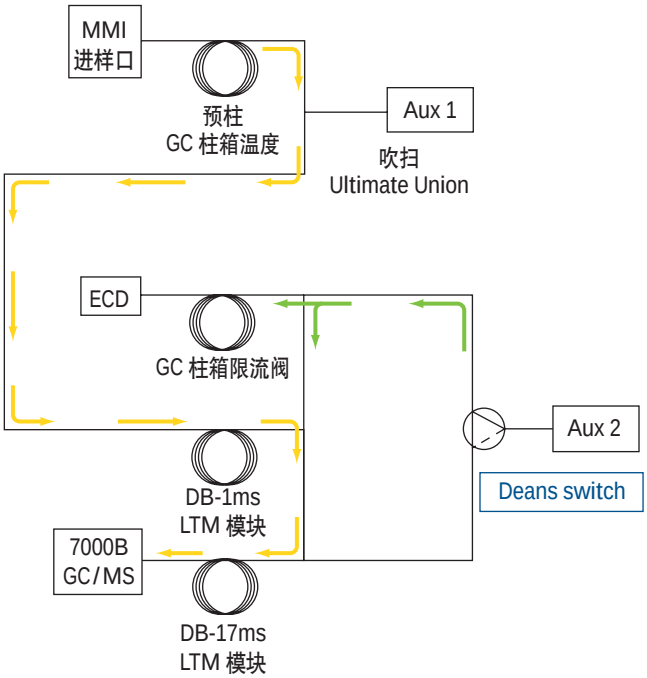


图 1. 用于 THCA 方法开发的色谱/质谱系统结构图

预柱和辅助压力控制模块(AUX EPC)为系统提供反吹功能以保护 LTM 分析柱。运行过程中，预柱以 1 psi 恒压模式进行反吹。在最初的 0.75 min，进样口的脉冲压力将反吹覆盖。使用反吹防止高沸点化合物在色谱柱上聚集，从而减少保留时间漂移、色谱峰变形和化学噪声，提高了定量的准确性；反吹还降低了离子源遭受污染的几率以及随之而来的清洗频率，同时缩短了运行时间。

方法同样将 LTM 色谱柱模块外接到 GC 色谱柱箱，可以分别对两个分析柱进行独立优化的温度控制（图 2）。这些独特的模块设计使迅速升温和降温成为可能。LTM 色谱柱模块可随时接入到安捷伦气相色谱，无需对进样口和自动进样器或检测器进行任何改变，而且可以通过 GC 软件进行控制。

这种独特的反吹和 LTM 技术增强了方法的性能，在 7 min 运行时间和 9 min 循环时间内即可获得准确的定量结果和卓越的灵敏度（参见下文）。

独特的 LTM 色谱柱模块确保系统实现快速升温和降温

图 2.　低热容(LTM)色谱柱模块与安捷伦 7890A 嵌接

卓越的灵敏度和准确的定量性能

该方法检出限（LOD）为 0.002 pg/mg，远低于推荐的限值 0.05 pg/mg，充分说明了其卓越的灵敏度（图 3）。方法的准确度也表现不俗，从 0.002 到 0.5 pg/mg范围内的 R^2 为 0.995 (图 4)。方法定量限为（LOQ）0.01 pg/mg，同样比毛发检测协会 (图 5)推荐的指导值 0.2 pg/mg 低一个数量级之多。方法同样提供了适应性定量分析报告，包括保留时间（包括保留时间上下限），响应水平，定量离子比（包括比值上下限）和计算结果。样品和 THCA-d3 内标物的总离子流图和定量离子及限定离子的 MRM 谱图同样列于报告中（图 6）。

LOD 为 0.002 pg/mg

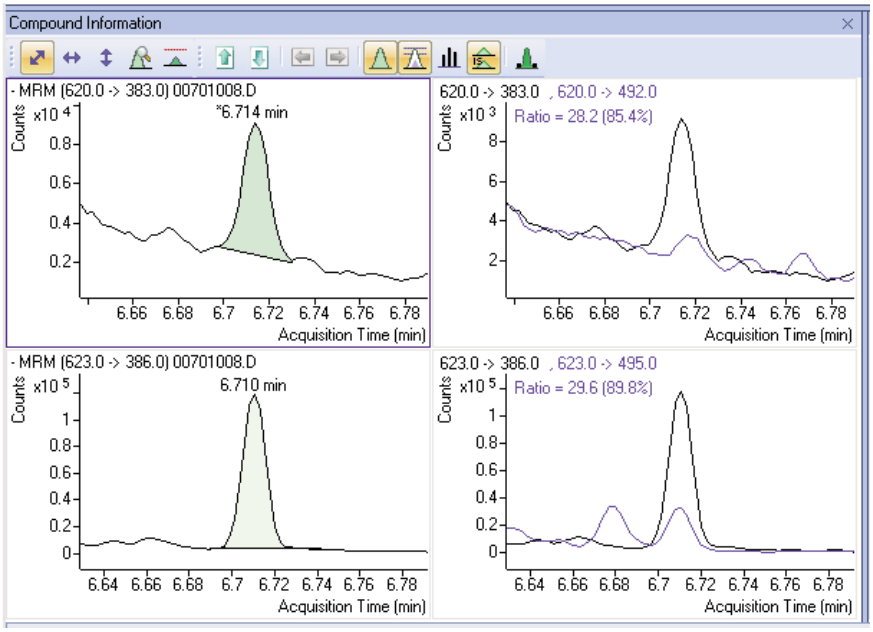


图 3. 头发样品加标 0.002 pg/mg LOD 水平的 THCA（上排） 和内标物（下排）的定量离子 MRM 谱图（左列）和定量离子及限定离子 MRM 叠加谱图（右列）

可靠的校准结果

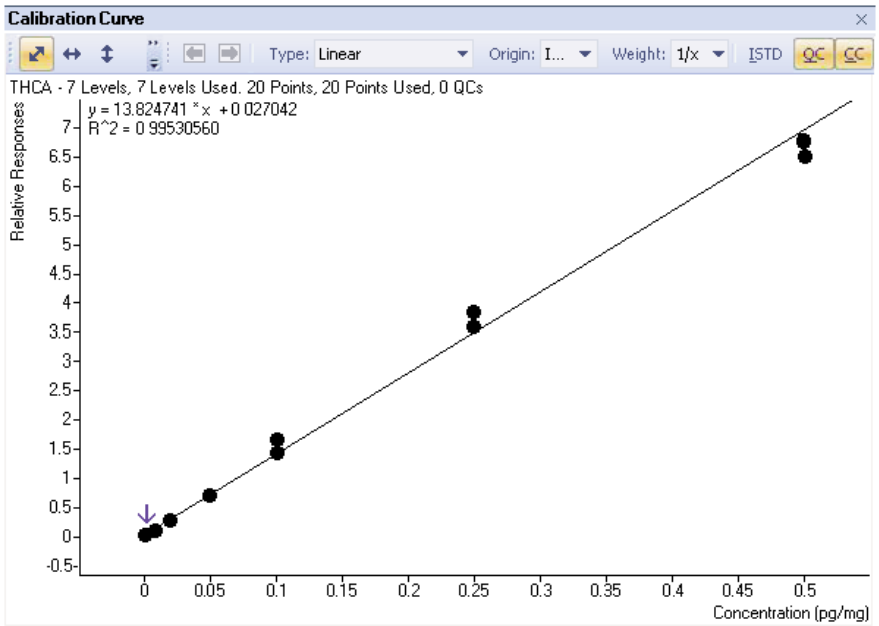


图 4. 头发样品 THCA 加标量分别为 0.002, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 和 0.5 pg/mg 的校准曲线

LOQ 为 0.01 pg / mg

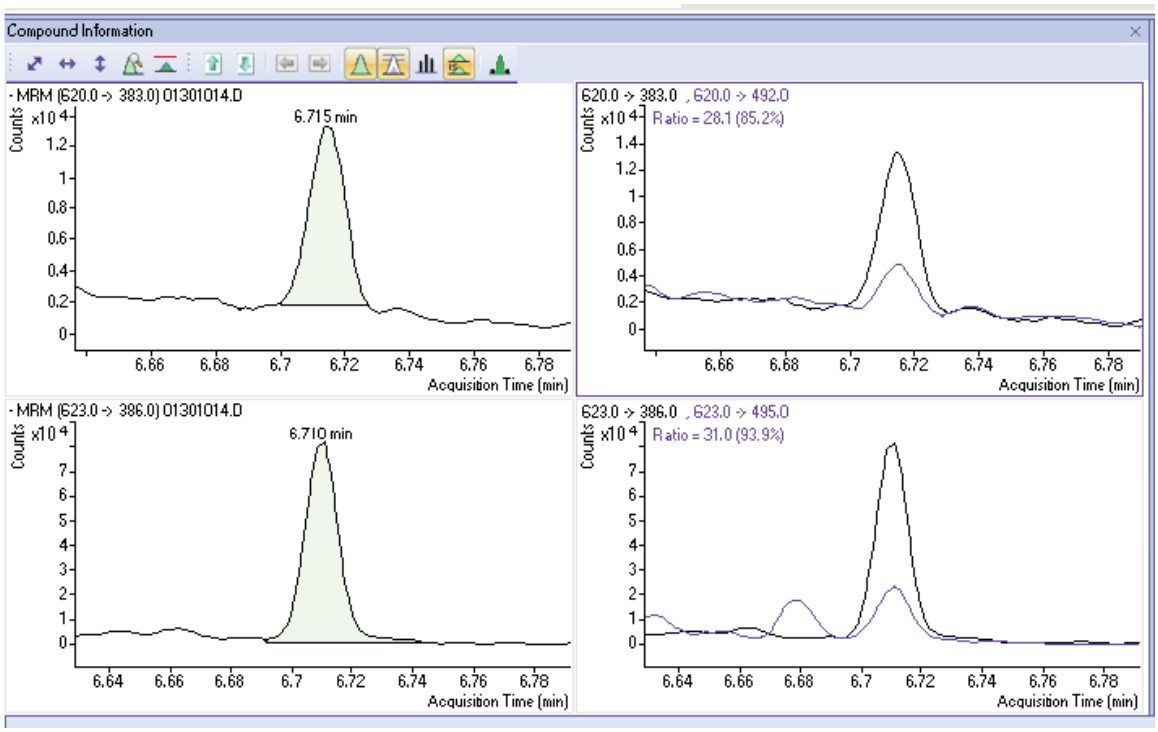


图 5. 头发样品加标 0.01 pg/mg LOQ 水平的 THCA（上排）和内标物（下排）的定量离子 MRM 谱图（左列）和定量离子及限定离子 MRM 叠加谱图（右列）

数据文件	01401015.D	样品瓶	14
操作者	DATASYSTEM01/Admin	稀释倍数	0.0
采集方法名称		样品信息	
数据采集时间	2010-10-08 16:24	校准最近更新时间	2010-11-28 09:34
样品名称和路径	0.01 pg/mg, D:/MassHunter/GCMS/1/data/PFAA Curve Extracted/		

化合物	Signal	RT	RT 范围	响应	QRatio	比值范围	计算结果
THCA-d3	623.0 -> 386.0	6.71		82558		35770 - 143081	
	623.0 -> 495.0			24962	30.2	23.1 - 42.9	
THCA	620.0 -> 383.0	6.71	6.38 - 7.05	10999			0.008
	620.0 -> 492.0			3908	35.5	23.1 - 42.9	

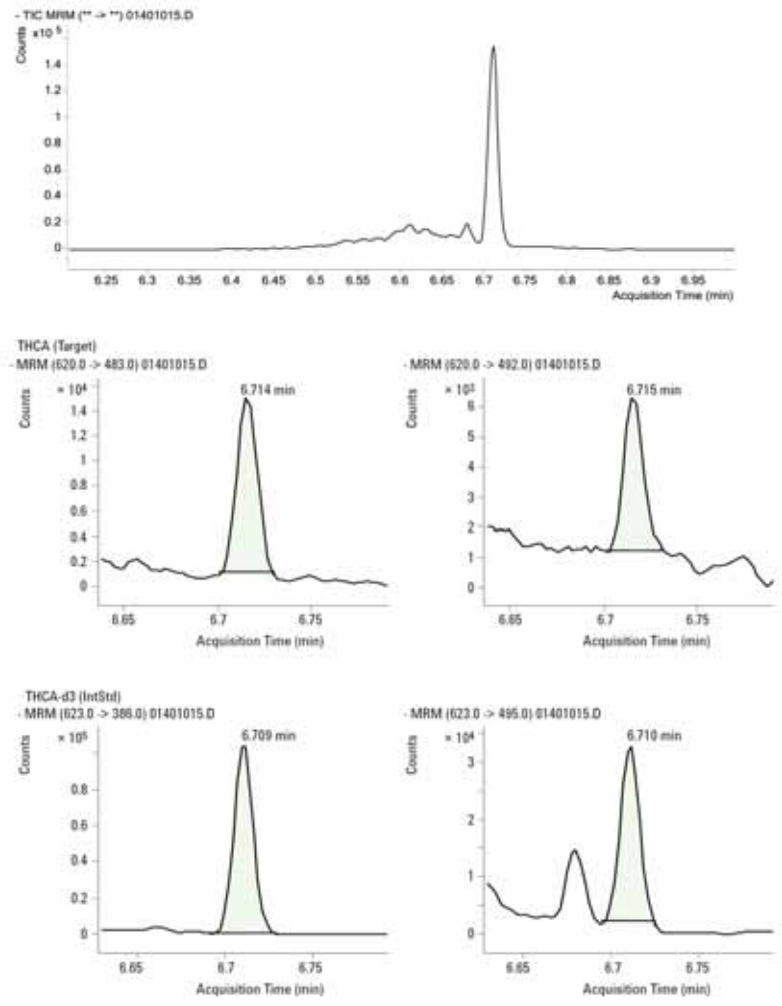


图 6.　0.01 pg/mg（定量限）加标头发样本的定量分析报告

结论

中心切割是一种经过时间考验的技术，能提高色谱分离性能，在本文介绍的方法中，将其与微板流路辅助反吹和低热容色谱柱程序升温模块相结合，发挥了更高的作用，运行时间 7 min，循环时间 9 min 的时间内能够提供对头发中 THCA 分析卓越的灵敏度（LOD 0.002 pg/mg；LOQ 0.01 pg/min）和稳定性。

参考文献

1. F. Feyerherm, R. Lowe, J. Stuff, D. Singer, “Rapid Multidimensional GC Analysis of Trace Drugs in Complex Matrices”, Gerstel publication AN-2007-8.
2. C. Moore, S. Rana, C. Coulter, F. Feyerherm, H. Prest, “Application of Two-dimensional Gas Chromatography with Electron Capture Chemical Ionization Mass Spectrometry to the Detection of 11-nor-D9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA) in Hair”, J. Anal. Toxicol. 30, 171–177 (2006).

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的直接或间接损失不承担任何责任。

本书中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

2011年3月21日中国印刷
5990-7535CHCN

Agilent Technologies

快速耐用的检测血中THC及其代谢物的方法

应用报告

法医/毒品控制

作者

Stephan Baumann
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara CA 95051
USA

摘要

使用SPE萃取及带反吹功能的GC/MS/MS，开发了一种耐用的检测血中THC及其代谢物的方法。THC 和11-OH-THC的定量动态线性范围为0.1-50 ng/mL，THCA的则为1-100 ng/mL。分析运行时间6 min，实验循环周期8 min。

引言

过去十年里，已进行了大量有关服用大麻对道路安全影响的研究。特别是研究了吸食大麻对驾驶能力的影响，其流行病学研究及相关大麻检测技术工作也多有发表。因此，一些国家针对药后驾驶（DUID）进行立法，措施各不相同。虽然已有许多类型的体液样品用于大麻检测，但血液样品分析仍被认为是能够发现这种危害最可靠的方法。血液中活性四氢大麻酚（THC）的检测也被雇主用于判断雇员服用大麻对工作表现的损害。气相色谱-质谱（GC/MS）联用是检测和定量分析血中THC及其代谢物的标准方法。

可靠检测血中THC的关键在于有效的THC萃取方法。由于串联质谱（MS/MS）可以消除干扰，从而可以提高血中THC及其代谢物检测的灵敏度和定量分析的可靠性。本应用报告介绍了采用高流量 Bond Elut Certify II SPE柱快速有效地萃取血中THC及其代谢物的方法。萃取物经过衍生化以提高其挥发性，衍生产物随后采用具备低热容（LTM）柱模块及反吹功能的Agilent 7890A三重串联四极杆GC/MS系统进行分析。然后再联接Agilent 7000B三重串联四极杆 GC/MS系统，多反应监测（MRM）模式下采用 MS/MS快速灵敏地检测THC及其代谢物11-OH-THC（11-羟基-Δ9-四氢大麻酚）和THCA（11-正-Δ9-四氢大麻

Agilent Technologies

酚-9-羧酸）。反吹功能可以提高系统的耐用性和分析速度，一次分析只需6 min的运行时间和8 min的循环时间。采用三重串联四极杆GC/MS系统的 MRM MS/MS 分析，得到了优良的结果，动态线性范围 0.1- 50 ng/mL。

实验部分

标准品和试剂

作为内标物使用的三氘代THC、11-OH-THC 和THCA（100 µg/mL 甲醇溶液），以及未标记THC、11-OH-THC和THCA（100 µg/mL 甲醇溶液）来自Cerilliant 公司（Round Rock, TX）。方法中内标溶液的浓度均为10 µg/mL。

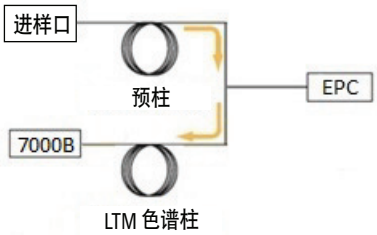
甲醇、乙腈、甲苯、乙酸乙酯、正己烷、冰醋酸和二氯甲烷来自Sigma Aldrich 公司（St. Louis, MO）。所有溶剂为高效液相色谱（HPLC）级或更高纯度，所有化学品为ACS级。实验中使用安捷伦高流量Bond Elut Certify II固相萃取柱。衍生试剂BSTFA（N, O-双（三甲硅基）三氟乙酰胺）和 TMCS（三甲基氯硅烷）购自Cerilliant公司。带有稳定剂草酸钾和氟化钠的普通人全血来自Bioreclamation 公司（Hicksville, NY），用此空白基质制备标准品溶液，绘制校正曲线。

仪器

实验在装备有多模式进样口（MMI）和LTM柱模块的Agilent 7890N 气相色谱仪上进行，联用7000B三重串联四极杆GC/MS。色谱分析采用一个用于反吹的预柱，以及通过一个吹扫Ultimate Union连接的低热容（LTM）色谱柱（图1）。仪器条件列于表1。

a.

进样到预柱上



b.

反吹预柱，以及THC及其代谢物在主色谱柱上的分离

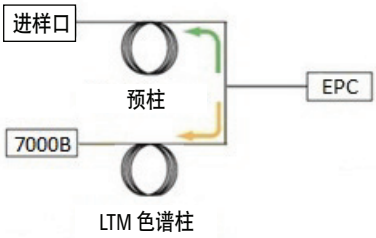


图1. 建立此方法所采用的反吹系统示意图。EPC: 电子气动控制模块；7000B: Agilent三重串联四极杆GC/MS 系统

表1. Agilent 7890N/7000B气相色谱和三重串联四极杆质谱条件

GC 运行条件	
预柱	从15 m × 0.25 mm, 0.25 µm HP-5 ms超高惰性柱（部件号19091S-431UI）上截取1 m
分析柱	15 m × 0.25 mm, 0.25 µm DB-17 ms LTM 柱模块（部件号122-4712LTM）
进样量	1 µL
进样口温度	恒温 280 °C
进样模式	0.5 min 脉冲不分流，35 psi
柱温箱温度	GC 柱温箱: 280 °C保持6 min（恒温）
LTM 模块:	100 °C保持50 s 以200 °C/min的速度从100 °C升到230 °C 以10 °C/min的速度从230 °C升到280 °C 280 °C保持1 min
载气	氦气，恒压模式 预柱：1 psi；柱1：5 psi；柱2：9.6 psi
传输线温度	300 °C
MS 条件	
调谐模式	自动调谐
增益	20
采集参数	EI 模式；多反应监测（MRM）
碰撞气	氮气，恒流，1.5 mL/min
冷却气	氦气，恒流，2.25 mL/min
溶剂延迟	3.0 min
MS温度	离子源 230 °C；四极杆150 °C

样品制备

将包含10 µg/mL 各内标（ISTD），并添加THC、11-OH-THC和THCA的2 mL血样移取到样品管中，加入4 mL乙腈混匀。以2500 rpm的转速离心5 min后，取上清液在35-40 °C下氮气吹至约3 mL，加入0.1 M醋酸钠溶液（pH 6.0）7 mL。

高流量Bond Elut Certify II SPE柱依次用2 mL甲醇、2 mL 0.1 M醋酸钠缓冲液（pH 6.0，含5%甲醇）冲洗。上样前保持柱填料湿润。以1- 2 mL/min的速度缓慢上样。然后用2 mL pH 6.0的醋酸钠缓冲液冲柱，在保持最大真空度的情况下干燥5 min，然后用1 mL正己烷冲洗。在中性条件下，采用2 mL正己烷-乙酸乙酯（95:5）混合液洗脱THC。然后柱子用5 mL甲醇-去离子水（1:1）冲洗。再次在最大真空度下干燥柱子约5 min，并用1 mL正己烷冲洗。用2 mL含1%醋酸的正己烷-乙酸乙酯（75:25）溶液洗脱11-OH-THC和THCA。将洗脱下来的THC及其代谢物合并，衍生前干燥。

洗脱液在温度不超过40 °C的条件下氮气吹干，残留物用60 µL甲苯复溶，然后加入含1%TMCS 的40 µL BSTFA进行衍生。样品管加盖密封，70 °C下加热20 min，然后进样至串联四极杆GC/MS系统分析。

分析参数

所设置安捷伦三重串联四极杆 GC/MS 系统参数列于表 2。

表2. Agilent 7000B 三重串联四极杆 GC/MS 系统分析参数

化合物	RT (min)	MRM	驻留时间 (ms)	碰撞能量 (EV)
THC (Δ9-四氢大麻酚)	3.5	386→303* 386→330 386→289	25 27 30	20 10 25
THC-d3	3.5	389→306* 389→330 389→292	10 11 15	20 10 25
11-OH-THC (11-羟基-Δ9-四氢大麻酚)	4.5	371→289* 371→305 371→265	24 26 27	20 15 15
11-OH-THC-d3	4.5	374→292* 374→308 374→268	10 12 12	20 15 15
THCA (11-正-Δ9- 四氢大麻酚-9-羧酸)	5.6	371→289* 488→297 488→371	23 44 29	15 20 20
THCA-d9	5.5	380→292* 497→306 497→380	15 30 22	15 20 20

*定量离子。所有其它离子对为定性离子

结果

采用高流量Bond Elut Certify II小柱对样品进行SPE处理

筛选生物体液样品中的滥用药物需要有耐用的、具有高的纯化效率和高回收率的分析方法。Bond Elut Certify固相萃取柱正是专为快速高效地从尿液及其它生物基质中提取非极性阴离子化合物而开发的[1]。混合型（非极性C8及强阴离子交换剂）吸附剂同时具有非极性、极性和离子交换性质，这种特性优势保证了用它萃取多种类型药物时具有快速、简单、重现性好和净化能力强的特点。这些小柱可以快速高效地从全血中萃取THC、11-OH-THC 和THCA，且具有高回收率。

反吹

反吹可以使所建立的分析方法非常耐用并且运行周期短，它可以防止高沸点化合物在色谱柱中积聚，从而减少了组分保留时间的漂移、峰形扭曲和化学噪声，提高了定量准确性。反吹也减少了MS源的污染及仪器的日常全面清洗工作，同时运行时间得以缩短。这最终使分析方法的耐用性增强，具有优良的动态线性范围，运行时间仅需6 min（不包括样品制备时间），循环周期仅需8 min。

为保持色谱分离度，安捷伦微板流路控制技术组件能够以最小的死体积实现简便快速的反吹操作。在进样阶段，进样口动力控制模块（PCM）在足够长的时间里保持较高的压力，确保分析物从预柱转移到分析柱中（图1a）。反吹时，进样口压力降到1 psi，迫使气流反向通过预柱并从分流口放空（图1b）。THC、11-OH-THC 和THCA 就以这种方式进入分析柱进一步分离，而高沸点化合物被反吹并通过分流口被清除。

低热容模块

本方法还于GC柱温箱外使用了一个低热容（LTM）柱模块，它可单独优化控制分析柱柱温（图1）。这些组件的独特设计可以实现色谱柱非常快速的升温和冷却。LTM柱模块可以方便地加在安捷伦GC上，而无需对进样器、自动进样器或检测器做任何改动。

动态线性范围

本方法THC和11-OH-THC的动态线性范围是0.1-50 ng/mL，THCA的是1-100 ng/mL（图2），符合行业规范要求。定量准确度高，三种分析物的R^2均为 0.999。

MRM 结果

使用MassHunter法医报告模板，THC及其两个代谢物的样品定量分析报告可以方便快捷地输出，报告附有包括内标在内的总离子流（TIC）色谱图和所有转换离子的谱图（图3-5）。请注意图中并没有干扰物的转换离子峰，甚至在每种分析物动态线性范围的浓度最低端也没有。

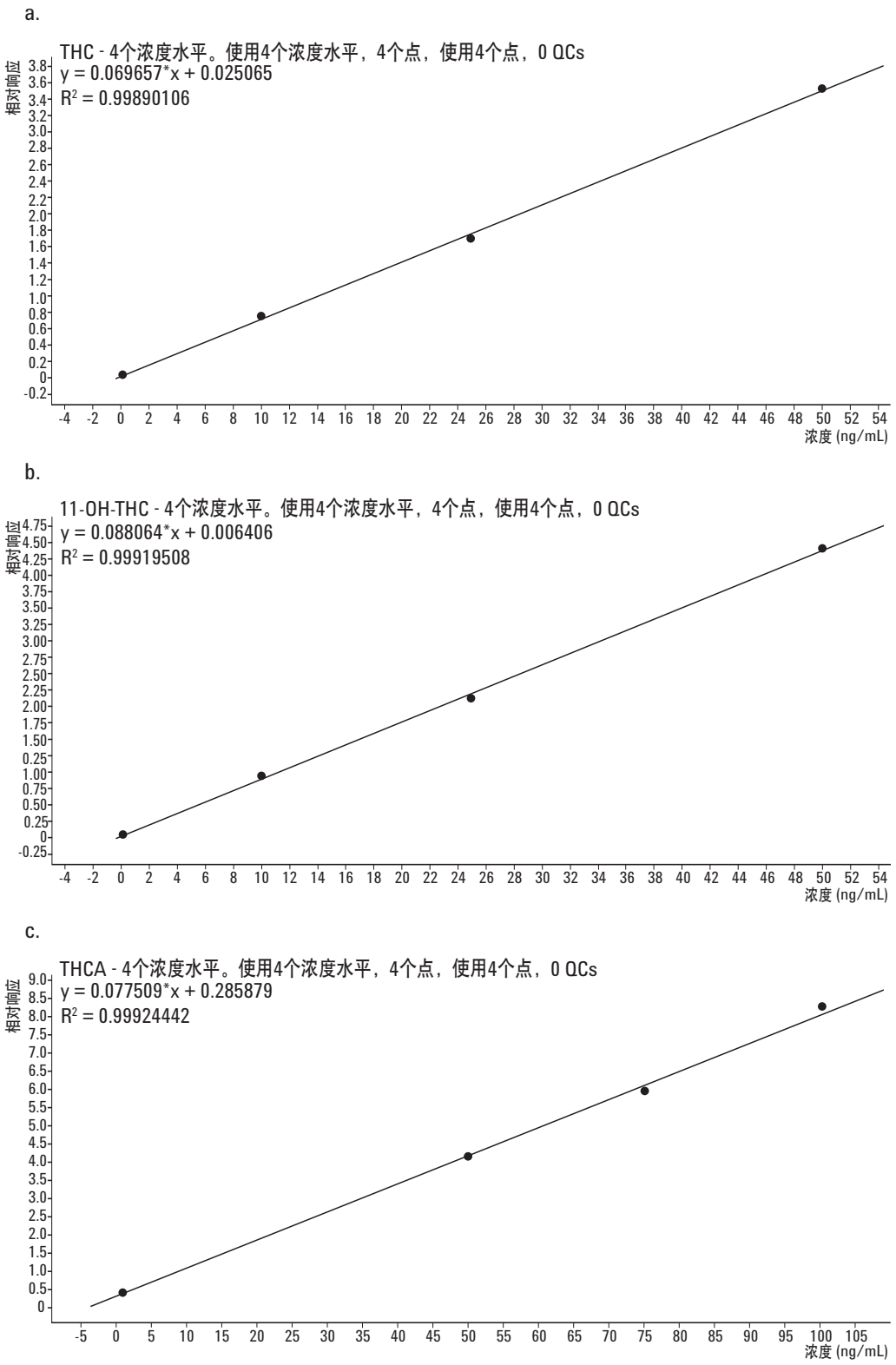
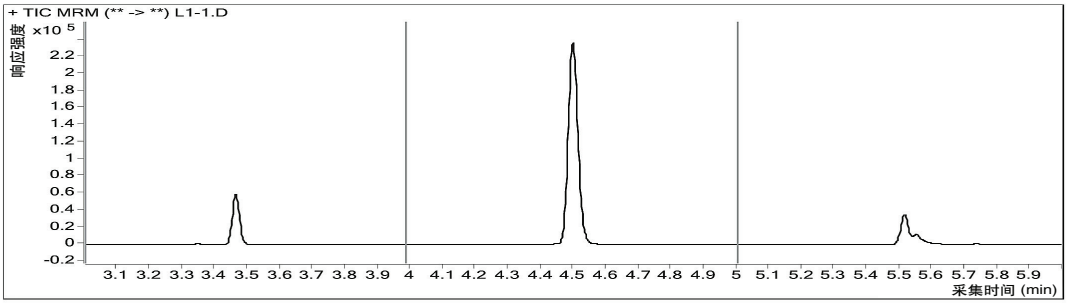


图2. 血液中THC (a)、11-OH-THC (b) 和THCA (c) 的校正曲线。THC和11-OH-THC采用 0.1、10、25和 50 ng/mL浓度点，THCA采用1、50、75和 100 ng/mL浓度点

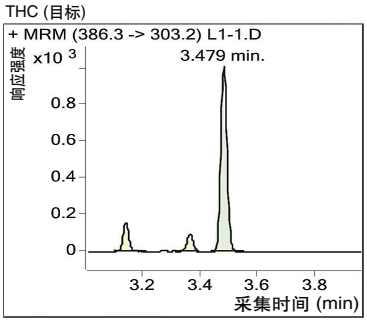
样品定量分析报告

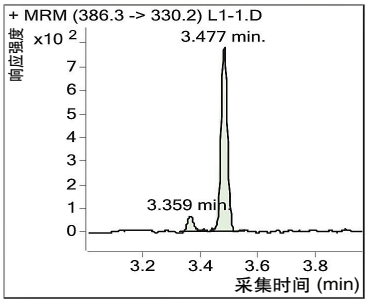
数据文件	:	L1-1.D
操作者	:	DATASYSTEM01/Admin
采集方法名称	:	LTM.THC.OMRM.7000.elex.m
采集时间	:	2011-04-28 18:19
样品名称及保存路径	:	L1-1, D:/MassHunter/GCMS/1/data/04-28-2011-redo/
样品瓶	:	3
稀释倍数	:	0.0
样品信息	:	
最后校正更新	:	2011-05-05 13:57

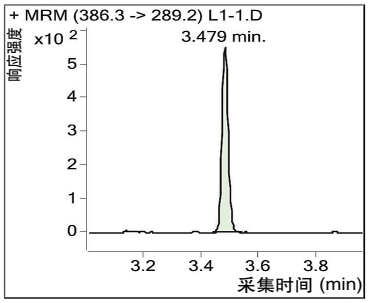
化合物	信号	保留时间	限度范围	响应值	含量	限度范围	终浓度
D3-THC	389.3 -> 306.2	3.46		37956			
	389.3 -> 330.2			32853	86.6	64.3-104.3	
	389.3 -> 292.2			18032	47.5	22.8-62.8	
THC	386.3 -> 303.2	3.48	3.29 - 3.64	1554			0.100
	386.3 -> 330.2			1237	79.7	62.4-102.4	
	386.3 -> 289.2			848	54.6	23.6-63.6	



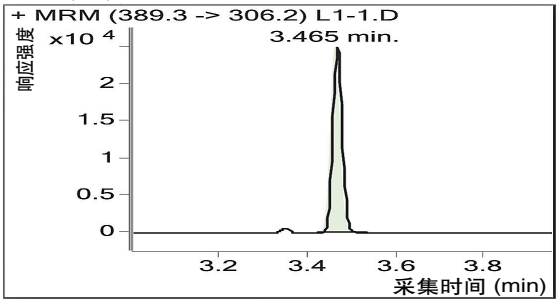
THC (目标)







D3-THC (内标)



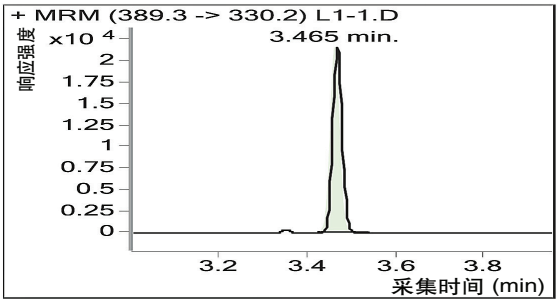
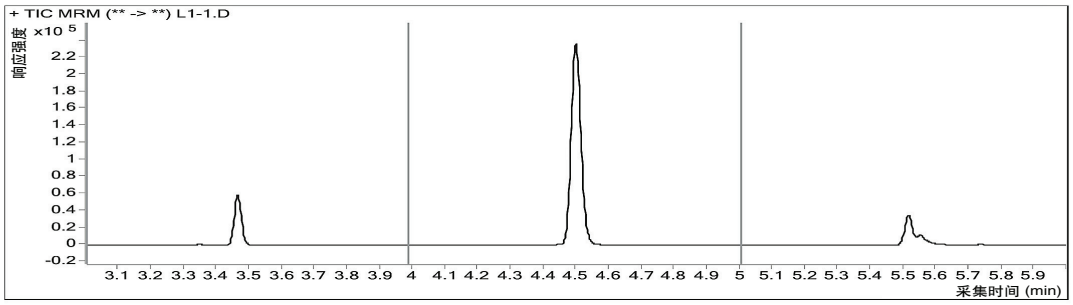


图3. 含0.1 ng/mL THC血液样品定量分析报告。RMS的信噪比为175:1，噪音区间 3.6 - 3.9 min

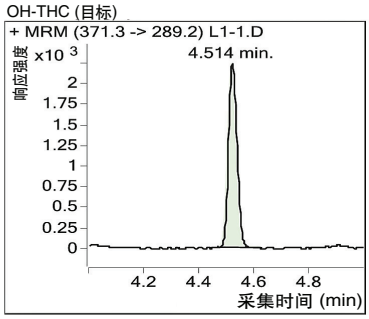
样品定量分析报告

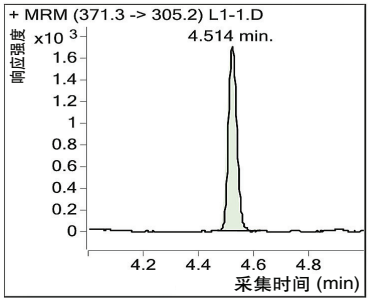
数据文件	:	L1-1.D
操作者	:	DATASYSTEM01\Admin
采集方法名称	:	LTM.THC.OMRM.7000.eiex.m
采集时间	:	2011-04-28 18:19
样品名称及保存路径	:	L1-1, D:\MassHunter\GCMS\1\data\04-28-2011-redo\
样品瓶	:	3
稀释倍数	:	0.0
样品信息	:	
最后校正更新	:	2011-05-05 13:57

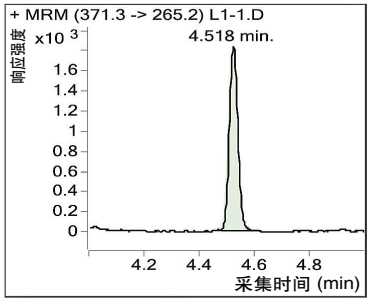
化合物	信号	保留时间	限度范围	响应值	含量	限度范围	终浓度
d3-OH-THC	374.3 -> 292.2	4.5		175705			
	374.3 -> 308.2			157882	89.9	68.8-108.8	
	374.3 -> 268.3			148545	84.5	59.4-99.4	
OH-THC	371.3 -> 289.2	4.51	4.27 - 4.72	4924			0.099
	371.3 -> 305.2			3707	75.3	67.4-107.4	
	371.3 -> 265.2			4050	82.3	58.2-98.2	



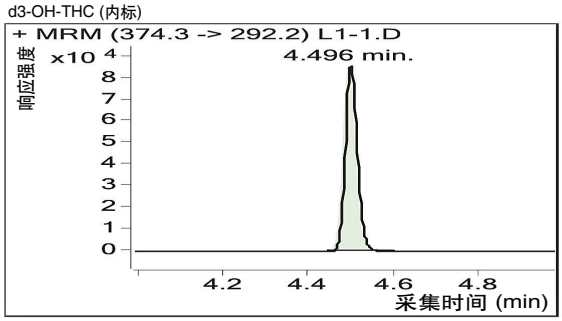
OH-THC (目标)

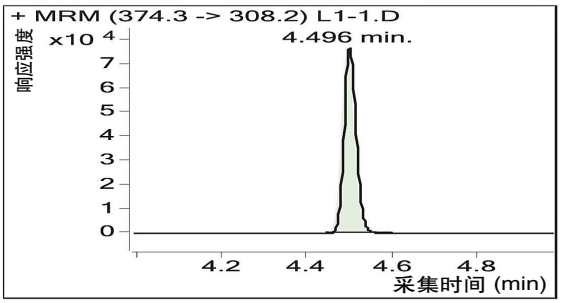






d3-OH-THC (内标)





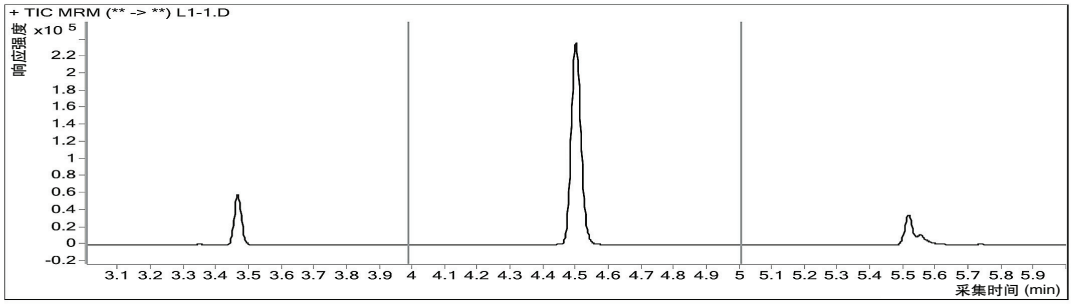
DrugQuantReport_Version4-2Qualifiers.xlsx Page 5 of 15 Printed at: 2:00 PM on: 5/5/2011

图4. 含0.1 ng/mL 11-OH-THC血液的样品定量分析报告。RMS信噪比为46:1，噪音区间4.6 -4.9 min

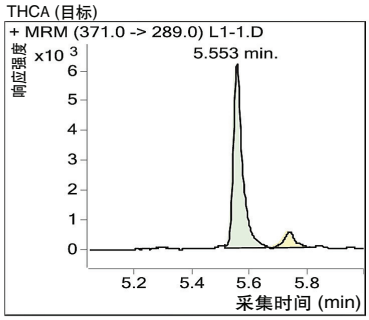
样品定量分析报告

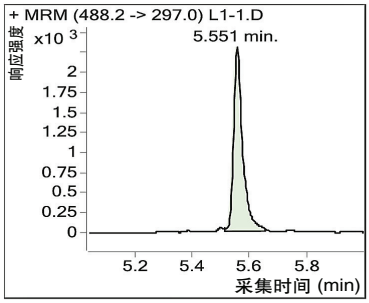
数据文件	:	L1-1.D
操作者	:	DATASYSTEM01\Admin
采集方法名称	:	LTM.THC.OMRM.7000.eiex.m
采集时间	:	2011-04-28 18:19
样品名称及保存路径	:	L1-1, D:\MassHunter\GCMS\1\data\04-28-2011-redo\
样品瓶	:	3
稀释倍数	:	0.0
样品信息	:	
最后校正更新	:	2011-05-05 13:57

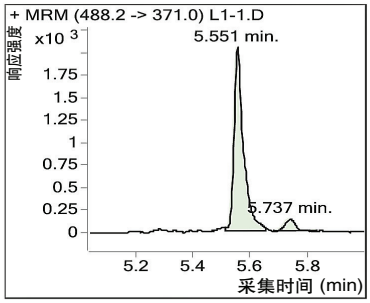
化合物	信号	保留时间	限度范围	响应值	含量	限度范围	终浓度
d9-THCA	380.0 -> 292.2	5.51		38358			
	497.0 -> 306.1			9800	25.5	5.6-45.6	
	497.0 -> 380.1			11765	30.7	12.5-52.5	
THCA	371.0 -> 289.0	5.55	5.26 - 5.82	13985			1.015
	488.2 -> 297.0			5124	36.6	9.1-49.1	
	488.2 -> 371.0			4758	34	14.4-54.4	



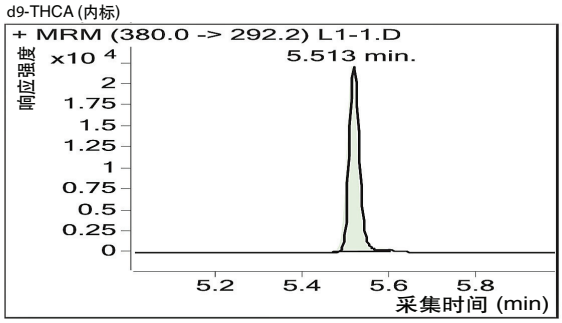
THCA (目标)







d9-THCA (内标)



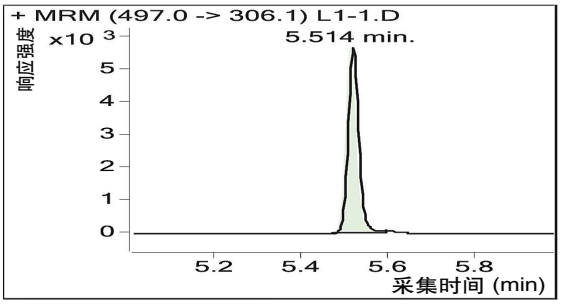


图5. 含1 ng/mL THCA血液样品的定量分析报告。RMS信噪比为39:1，噪音区间5.1-5.3 min

结论

带有LTM的Agilent 7890N 气相色谱系统与Agilent 7000B三重串联四极杆GC/MS系统联用，建立了快速耐用的分析血中THC及其代谢物的方法。采用高流量Bond Elut Certify II SPE柱、GC柱反吹技术及MRM检测，可有效消除所有干扰，THC和11-OH-THC的定量动态线性范围是0.1-50 ng/mL，THCA的是1-100 ng/mL。LTM组件和反吹技术可以实现快速分析，分析运行时间6 min，实验循环周期8 min。

参考文献

1. R.M Sears, Solid Phase Extraction of THD, THC-COOH and 11-OH-THC from Whole Blood, Agilent Technologies Application Note 00315.

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、描述及技术规格等如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

中国印刷
2011年7月5日
5990-8456CHCN

Agilent Technologies

唾液

简化唾液检测过程

唾液分析用于工作场所药物检测、刑事司法、交通案收集、事故后调查、溯因检测和疼痛治疗计划中。唾液易于采集、难以掺假且技术支持很宽的药物检测范围，因此成为了一种应用越来越广泛的药物检测基质。

安捷伦与唾液检测领域的全球领导者 Immunalysis 公司携手合作，开发出用于唾液中药物的采集、前处理、筛查、确认以及定量的首款全程工作流程解决方案。

了解有关滥用药监测
替代基质的更多信息：
agilent.com/chem/forensics

返回目录

唾液中的合成大麻素类成分

应用简报

法证与毒理学

作者

Cynthia Coulter，Margaux Garnier 和
Christine Moore
毒理学研究与开发
Immunalysis 公司，
829 Towne Center Drive，
Pomona，California 91767
美国

前言

2011 年，“合成大麻素类”或“香料”化合物中，有五种在美国被禁用。它们是：

- 1-戊基-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-018)
- 1-丁基-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-073)
- 1-[2-(4-吗啉) 乙基]-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-200)
- 5-(1,1-二甲基庚基)-2-[(1R,3S)-3-羟基环己基]-苯酚 (CP-47,497)
- 5-(1,1-二甲基辛基)-2-[(1R,3S)-3-羟基环己基]-苯酚(大麻环己醇；CP-47,497 C8 同系物)

服用者描述这些药物具有类似大麻的作用，并且这些化合物中有一些与大麻受体有很强的结合作用。11-羟基-Δ^8-四氢大麻酚的（–）-1,1-二甲基庚基取代类似物（1,1-二甲基庚基-11-羟基四氢大麻酚），代号 HU-210，据报道它曾在 2009 年美国海关与边境保护局缉获的“香料黄金”、“香料白银”和“香料钻石”中被发现。HU-210 的效力被认为超过 Δ^9-四氢大麻酚（Δ^9-THC）100 倍，并且作为一种大麻类似物已被列入控制物质。JWH-250 也是我们经常遇到的品种，故我们也把它列入研究范围。

Agilent Technologies

作为一种在路边和工作场所进行药物检测的样本，唾液检测正日益流行。它容易采集，不具有侵害性，并且可获得近期用药的信息。本文工作中使用了 Quantisal 装置来收集唾液样本，并且描述了“香料”成分的检测过程。

样本收集装置、试剂和标准品

收集唾液样本的 Quantisal 装置包括了一个可以放在嘴里的棉质采集垫。当采集到 1 mL 唾液（±10%）时，吸收体积足量指示剂会变为蓝色，然后将采集垫放入缓冲液（3 mL）中，使可用于分析的样本总体积为 4 mL（3 mL 缓冲液 + 1 mL 唾液）。用于检测的药物浓度也会相应改变。

固相萃取小柱（Bond Elut Plexa）和液相色谱柱（ZORBAX RRHT）为安捷伦科技公司产品。JWH-018、JWH-073、JWH-200、JWH-250、HU-210、CP-47497 和 CP-47497 C8 同系物，以及氘代化合物 d9-JWH-018 和 d7-JWH-073 标准品购自 Cayman Chemicals 公司。

校准溶液与质控样品的制备

将氘代内标（*d9*-JWH-018 和 *d7*-JWH-073）和未标记的药物标准品制备为浓度 100 µg/mL 的甲醇溶液。用甲醇稀释适量贮备液到 10 µg/mL 的浓度，作为工作溶液。不用时，溶液于 –20 °C 贮存。向不含药物的合成唾液中加入不同浓度的化合物，制成质控样品。每批测试样本包括不含药物的阴性样品、4 ng/mL 和 40ng/mL 浓度的阳性质控样品。

样品制备

7 个用唾液制备的校准标准溶液中，各分析物的浓度依次为 0.5、2、5、10、20、50 和 100 ng/mL，加入氘代内标（10 ng/mL）。

使用 Agilent Bond Elut Plexa（30 mg/1 mL；部件号 12109301）固相萃取小柱。

1. 活化：甲醇（0.5 mL）；0.1 M 乙酸溶液（0.1 mL）
2. 取校准工作溶液、质控样品和样品各 1 mL，分别加入乙酸溶液（0.1 M；pH 4，1 mL）
3. 上样
4. 柱淋洗：去离子水 : 冰乙酸（80 : 20；1 mL）；去离子水 : 甲醇（40 : 60；1 mL）
5. 柱干燥（5 min）
6. 洗脱酸性/中性化合物：己烷:冰乙酸（98 : 2；2 mL）
7. 干燥小柱时蒸干提取物（7 min）
8. 洗脱碱性组分到相应的试管中：乙酸乙酯 : 氢氧化铵溶液（98 : 2；2 mL）
9. 40 °C 下氮吹蒸发至干。
10. 甲醇复溶样品残渣（50 µL）；转移至自动进样瓶中；旋紧瓶盖
11. 采用 LC-MS/MS 进行分析

液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）

安捷伦科技 1200 系列液相色谱泵与 Agilent 6430 三重四级杆 LC/MS 系统联用，采用电喷雾离子化模式（ESI），根据化合物的性质选择正离子或负离子检测。

色谱柱	Agilent ZORBAX RRHT Extend C18，（2.1 × 50 mm，1.8 µm，部件号 727700-902）
柱温	60 °C
进样体积	5 µL
流动相	溶剂 A：0.2% 乙酸溶液和溶剂 B：乙腈
	时间 0 min：95% A；5% B；5 min：100% B；7 min：5% B
	运行时间 9.2 min；后运行时间 3 min
	流速 0.5 mL/min
氮气温度	350 °C
干燥气流量	10 L/min
雾化器压力	55 psi
毛细管电压	+4000 V 正离子模式
	–4000 V 负离子模式

为每种药物选择并优化了两个离子对。表1列出了转换离子对、母离子（M+1；M-1）的优化碎裂电压和子离子碎片的碰撞能量。每一个序列分析要求其定量离子和定性离子的比率应在±20%以内，以满足阳性结果的判断标准。

表1. 多反应监测（MRM）transitions；优化的碎裂电压；在10 µg/mL浓度时定量分析“香料”化合物的允许离子转换范围

化合物	离子对	碎裂电压（V）	碰撞能量（eV）	极性	定量和定性离子对比率（范围）
d9-JWH-018	351.3 > 223.4	140	20	正离子	n/a
JWH-018	342.2 > 155.1	120	20	正离子	16–24
	342.2 > 214.2	120	20		
JWH-250	336.3 > 200.2	120	12	正离子	69–104
	336.3 > 188.2	120	20		
d7-JWH-073	335.3 > 207.2	120	20	正离子	n/a
JWH-073	328.2 > 155.1	120	20	正离子	60–90
	328.2 >127.1	120	35		
JWH-200	385.3 > 155.1	140	20	正离子	54–81
	385.3 > 114.2	140	25		
CP 47497 C8	331.3 > 313.3	160	25	阴离子	70–104
	331.3 > 259.3	160	35		
CP 47497	317.3 > 299.2	160	20	阴离子	75–113
	317.3 > 245.2	160	30		
HU-210	385.3 > 367.4	120	30	阴离子	13–20
	385.3 > 281.3	120	45		

标下划线的离子对用于定量；n/a= 不可用于内标

图 1 所示 10 ng/mL 浓度时化合物一级转换离子的色谱图；各化合物一级和二级离子对的比率也是在 10 ng/mL 浓度时测定的。

采集垫的回收率

制备各化合物添加浓度均为 4 和 40 ng/mL 的六个合成唾液样品。将采集垫置于上述样品液中收集 1 mL（±10%），这可以由植入采集器的蓝色体积足量指示剂来判断。然后将采集垫转移到 Quantisal 缓冲液中，加盖并放置过夜，模拟样品运输到实验室的过程。第二天取部分样品进行分析。采集垫的回收量与绝对浓度（100%）进行对比，绝对浓度系将药物加到缓冲液中，不加入采集垫室温放置过夜，然后提取和分析得到。

各化合物的采集垫提取百分回收率在 4 和 40 ng/mL（n = 6），两个浓度时均大于 60%。最高的是 4 ng/mL 时 HU-210 的回收率，达到 86%；最低的是 40 ng/mL 时 JWH-073 的回收率，只有 61%。两个浓度水平的回收率基本上一致（表 2）。

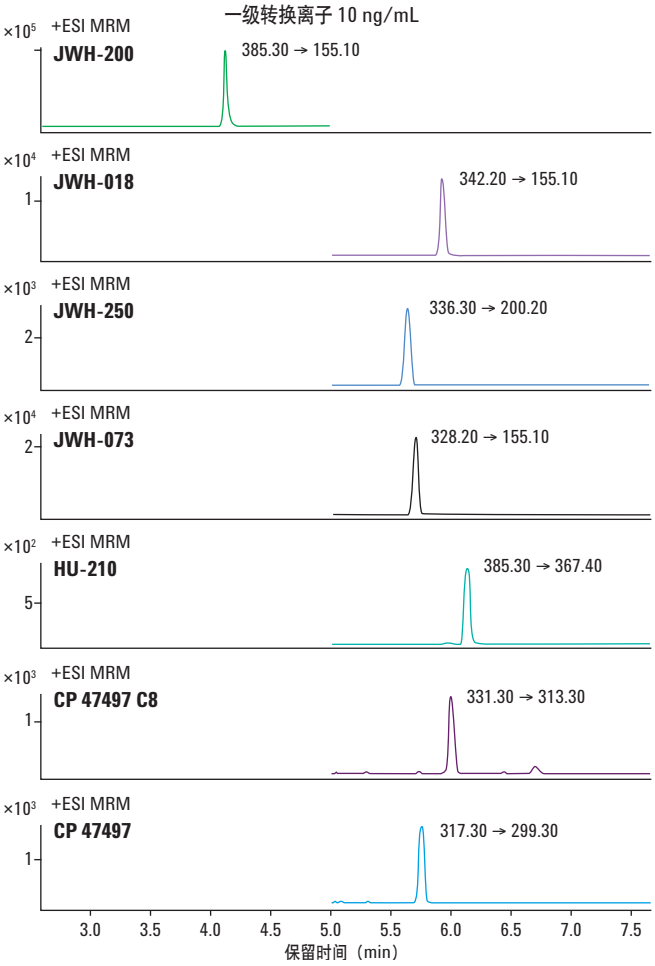


图 1. 10 ng/mL 浓度时的一级转换离子

表 2. 方法学验证数据

	JWH-018	JWH-073	JWH-200	JWH-250	CP 47497	CP 47497 C8	HU-210
LOQ（ng/mL）	0.5	0.5	0.5	2	0.5	2	5
日内误差							
4 ng/mL	3.9%	3.6%	5.0%	3.4%	4.9%	3.9%	8.6%
40 ng/mL	2.2%	2.1%	6.0%	2.0%	4.1%	4.3%	5.6%
日间误差							
4 ng/mL	8.8%	9.6%	6.2%	11%	7.7%	11%	10%
40 ng/mL	8.5%	7.9%	6.2%	11%	10%	11%	12%
采集垫回收率							
4 ng/mL	65.5%	67.4%	85.0%	66.5%	77.7%	76.0%	86.4%
40 ng/mL	70.6%	61.4%	81.4%	75.1%	71.3%	78.2%	75.7%
基质效应	-55%	-45%	-55%	-73%	-64%	-55%	-49%
处理效率	40%	51%	56%	24%	38%	45%	51%

数据分析

使用浓度范围 0.5–100 ng/mL 的线性回归分析绘制校准曲线。采用 Agilent MSD 软件计算每个浓度点中目标分析物与内标的峰面积比。数据拟合成一条线性最小二乘回归曲线，曲线未强制通过原点，且等权重。每种化合物监测了两种转换离子对用于确证分析；内标监测了一种离子对。定性离子对的比率要求在使用可接受的已知校准标准品所确定比率的 ±20% 之内。

线性和灵敏度

将溶液连续稀释到一个化合物可准确定量的最低浓度点获得方法的定量限（LOQ），即色谱峰形、保留时间（校准标准品的 2%）和定性离子对比率（± 20%）与 10 ng/mL 校准标准品测定结果比较是可以接受的。LOQ 的定量值必须在目标浓度的 ±20%以内。JWH-018、JWH-073、JWH-200 和 CP 47497 的定量限是 0.5 ng/mL；CP 47497 C8 和 JWH-250 的是 2 ng/mL；HU-210 的是 5 ng/mL（图 2）。所有化合物从 LOQ 到 100 ng/mL 浓度范围内线性关系良好（$R^2 > 0.99$；n = 5）。

基质效应

制备一个浓度为 10 ng/mL 的未经提取的药物标准品溶液，另外制备不含药物的基质提取物和阴性质控样品（提取物中只含有内标）。唾液中各化合物回收率的测定如下：首先测得浓度为 10 ng/mL 提取物（n=3）的响应 {R_{ES}}。然后提取唾液并向浓度为 10 ng/mL 的后提取物中加入药物（n=3）{R_{PES}}。通过方程式（R_{ES}/ R_{PES}）× 100 计算百分回收率。

基质效应（离子抑制）导致的响应下降通过评价未经提取的 10 ng/mL 纯药物标准品（n=3）峰面积响应来测定 {R_{NES}}。该未经提取溶液作为提取样本在相同的复溶溶剂中被分析。百分基质效应可通过公式[（R_{PES} / R_{NES}）-1] × 100 计算。总处理效率可通过公式（R_{ES} / R_{NES}）× 100 计算。

可见离子抑制效应非常明显，但是可以通过对样品进行固相萃取和使用氘代内标来限制。

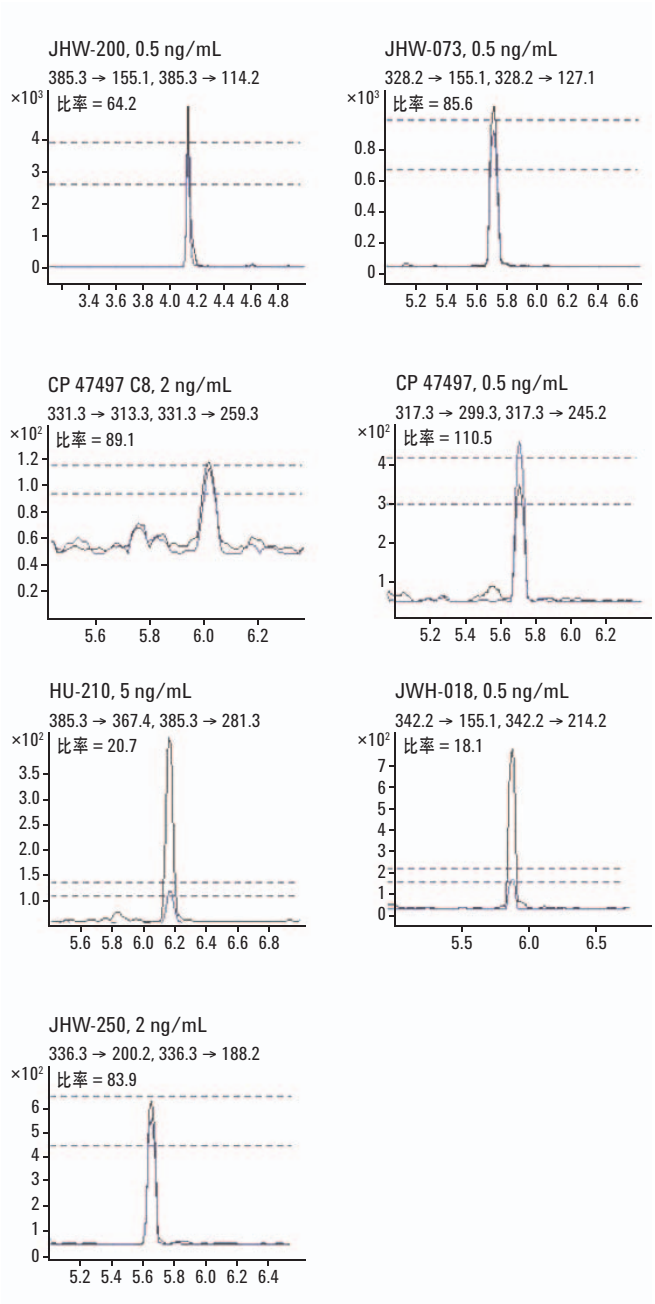


图 2. ±20% 比率的 LOQ 浓度

选择性

使用 Quantisal 装置采集了五个不含药物的唾液样本。各样本取适量按照上述步骤进行提取和分析，以考察内源性化合物或者运输用缓冲液带来的潜在干扰。

另外，在剩余的上述不含药物的唾液中加入常见的滥用药物至浓度为 2000 ng/mL，按照上述步骤提取、分析。

THC	阿米替林
THC-COOH	环苯扎林
11-OH-THC	丙咪嗪
大麻酚	度硫平
大麻二酚	多塞平
可卡因	氟西汀
苯甲酰爱康宁	舍曲林
去甲古柯碱	曲米帕明
可卡乙碱	普罗替林
可待因	氯丙嗪
吗啡	氯米帕明
6-AM	去甲替林
6-AC	帕罗西汀
羟考酮	地昔帕明
羟吗啡酮	溴西泮
氢可酮	阿普唑仑
氢吗啡酮	氯硝西泮
苯丙胺	劳拉西泮
去氧麻黄碱	奥沙西泮
MDMA	地西泮
MDA	咪达唑仑
MDEA	氟西泮
芬特明	氟硝西泮
芬太尼	去甲西泮
苯环利啶	三唑仑
曲马多	替马西泮
卡立普多	硝西泮
甲丙氨酯	氯氮卓
西酞普兰	美沙酮
文拉法辛	

不含药物提取物中未发现内源性干扰；也未发现来自常见药物的外源性干扰，如可在高浓度下被分析的 THC 及其主要代谢物。

误差

制备同时加标所有化合物的浓度为 4 ng/mL 和 40 ng/mL 的样品。每个浓度的样品连续五天（n=6；日内不精密度）按照上述步骤操作（n=30；日间不精密度）进行分析。两个浓度的所有药物检测日内误差小于 9%，日间误差小于 12%（表 2）。

真实样品

样本采自两名当地志愿者，他们曾购买了这些当时在美国仍合法的化合物。受试对象 1 吸食了“Blueberry Posh”，受试对象 2 吸食了“黑曼巴”。使用 Quantisal 唾液收集装置，采集吸食前，以及吸食后不同时间点的样本。采集受试对象 1 吸食后 20 min、40 min、1 h、2 h 和 12 h 的样本；采集受试对象 2 吸食后 20 min、40 min、1 h、5 h 和 12 h 的样本。这些样本在采集后的第二天进行分析，然后剩余样本在 4 °C 贮存一个月后用另一种方法重新分析。一年后，采用相同的程序再测定一遍。当然，现在已经没有可能获得真实样本了，因为现在拥有这些化合物已属非法行为。

两个制备物中检测到的主要活性的化合物是 JWH-018。4 °C 贮存一个月后对样本重新分析，发现目标化合物极其稳定，两次检测浓度几乎完全相同。4 °C 贮存一年后对样本重新分析，发现受试对象 1 的检测结果与一年前基本相同；受试对象 2 的样品检测后发现，那些原来浓度就很低的化合物，现在更低了（见图 3）。

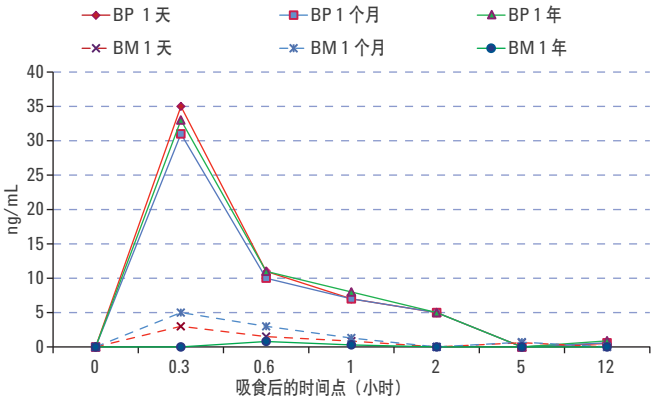


图 3. 4 °C 贮存的真实样本的稳定性

图 4 为提取离子色谱图，显示了吸食 40 min 后样本（受试对象 1）的离子对和围绕定性离子对强度 ±20% 的可接受范围；JWH-018 的浓度是 11 ng/mL。

结论

本文首次报道了唾液中多种“香料”化合物的同时测定。分析步骤适用于采用 Quantisal 装置收集的含有合成大麻素类成分样本的分析，样本中两种浓度采集垫的提取回收率均大于 60%。跟踪两种不同品牌草本产品的单次吸食过程，发现在单次吸食 20 min 后唾液中检测到最高浓度的 JWH-018。即使一年之后，单次吸食“Blueberry Posh”12 h 后的唾液样本中仍可检测到 JWH-018。

更多信息

这些数据代表典型结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

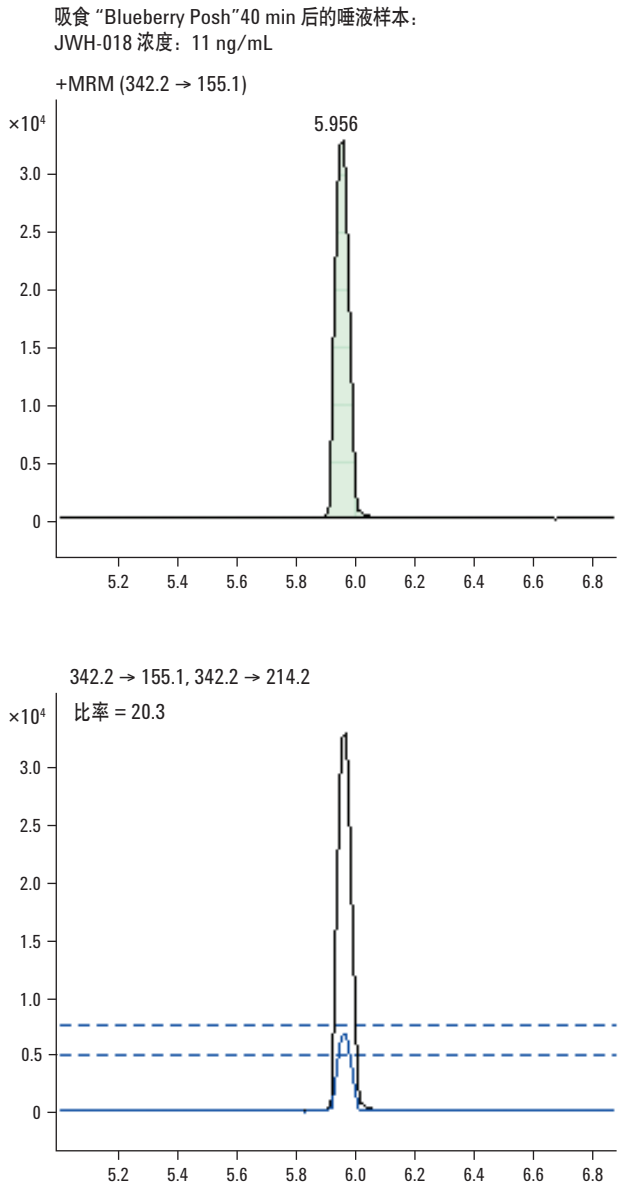


图 4. 受试对象 1 吸食 40 min 后的唾液样本；JWH-018 = 11ng/mL

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 17 日，中国印刷
5990-9679CHCN

Agilent Technologies

化学合成毒品

克服分析危险化学合成毒品的障碍

化学合成毒品（如“浴盐”、“摇头丸”、“香料”和 K2）是专为规避禁毒法律而研发的非法药物的合成类似物。化学合成毒品有害甚至致命，因此人们对这类物质可靠检测与确证的需求日益迫切。但是，由于存在基质干扰，分析体内和体液中的化学合成毒品都很困难。

安捷伦提供了样品前处理方案、分离技术与强大谱库的组合，可帮助您满足这一快速发展的毒理学领域的需求。

了解有关用于化学合成毒品的样品前处理和分析方法的更多信息：
agilent.com/chem/forensics

返回目录

唾液中的合成大麻素类成分

应用简报

法证与毒理学

作者

Cynthia Coulter，Margaux Garnier 和
Christine Moore
毒理学研究与开发
Immunalysis 公司，
829 Towne Center Drive，
Pomona，California 91767
美国

前言

2011 年，“合成大麻素类”或“香料”化合物中，有五种在美国被禁用。它们是：

- 1-戊基-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-018)
- 1-丁基-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-073)
- 1-[2-(4-吗啉) 乙基]-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-200)
- 5-(1,1-二甲基庚基)-2-[(1R,3S)-3-羟基环己基]-苯酚 (CP-47,497)
- 5-(1,1-二甲基辛基)-2-[(1R,3S)-3-羟基环己基]-苯酚(大麻环己醇；CP-47,497 C8 同系物)

服用者描述这些药物具有类似大麻的作用，并且这些化合物中有一些与大麻受体有很强的结合作用。11-羟基-Δ^8-四氢大麻酚的（–）-1,1-二甲基庚基取代类似物（1,1-二甲基庚基-11-羟基四氢大麻酚），代号 HU-210，据报道它曾在 2009 年美国海关与边境保护局缉获的“香料黄金”、“香料白银”和“香料钻石”中被发现。HU-210 的效力被认为超过 Δ^9-四氢大麻酚（Δ^9-THC）100 倍，并且作为一种大麻类似物已被列入控制物质。JWH-250 也是我们经常遇到的品种，故我们也把它列入研究范围。

Agilent Technologies

作为一种在路边和工作场所进行药物检测的样本，唾液检测正日益流行。它容易采集，不具有侵害性，并且可获得近期用药的信息。本文工作中使用了 Quantisal 装置来收集唾液样本，并且描述了“香料”成分的检测过程。

样本收集装置、试剂和标准品

收集唾液样本的 Quantisal 装置包括了一个可以放在嘴里的棉质采集垫。当采集到 1 mL 唾液（±10%）时，吸收体积足量指示剂会变为蓝色，然后将采集垫放入缓冲液（3 mL）中，使可用于分析的样本总体积为 4 mL（3 mL 缓冲液 + 1 mL 唾液）。用于检测的药物浓度也会相应改变。

固相萃取小柱（Bond Elut Plexa）和液相色谱柱（ZORBAX RRHT）为安捷伦科技公司产品。JWH-018、JWH-073、JWH-200、JWH-250、HU-210、CP-47497 和 CP-47497 C8 同系物，以及氘代化合物 d9-JWH-018 和 d7-JWH-073 标准品购自 Cayman Chemicals 公司。

校准溶液与质控样品的制备

将氘代内标（*d9*-JWH-018 和 *d7*-JWH-073）和未标记的药物标准品制备为浓度 100 µg/mL 的甲醇溶液。用甲醇稀释适量贮备液到 10 µg/mL 的浓度，作为工作溶液。不用时，溶液于 –20 °C 贮存。向不含药物的合成唾液中加入不同浓度的化合物，制成质控样品。每批测试样本包括不含药物的阴性样品、4 ng/mL 和 40ng/mL 浓度的阳性质控样品。

样品制备

7 个用唾液制备的校准标准溶液中，各分析物的浓度依次为 0.5、2、5、10、20、50 和 100 ng/mL，加入氘代内标（10 ng/mL）。

使用 Agilent Bond Elut Plexa（30 mg/1 mL；部件号 12109301）固相萃取小柱。

1. 活化：甲醇（0.5 mL）；0.1 M 乙酸溶液（0.1 mL）
2. 取校准工作溶液、质控样品和样品各 1 mL，分别加入乙酸溶液（0.1 M；pH 4，1 mL）
3. 上样
4. 柱淋洗：去离子水 : 冰乙酸（80 : 20；1 mL）；去离子水 : 甲醇（40 : 60；1 mL）
5. 柱干燥（5 min）
6. 洗脱酸性/中性化合物：己烷:冰乙酸（98 : 2；2 mL）
7. 干燥小柱时蒸干提取物（7 min）
8. 洗脱碱性组分到相应的试管中：乙酸乙酯 : 氢氧化铵溶液（98 : 2；2 mL）
9. 40 °C 下氮吹蒸发至干。
10. 甲醇复溶样品残渣（50 µL）；转移至自动进样瓶中；旋紧瓶盖
11. 采用 LC-MS/MS 进行分析

液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）

安捷伦科技 1200 系列液相色谱泵与 Agilent 6430 三重四级杆 LC/MS 系统联用，采用电喷雾离子化模式（ESI），根据化合物的性质选择正离子或负离子检测。

色谱柱	Agilent ZORBAX RRHT Extend C18，（2.1 × 50 mm，1.8 µm，部件号 727700-902）
柱温	60 °C
进样体积	5 µL
流动相	溶剂 A：0.2% 乙酸溶液和溶剂 B：乙腈
	时间 0 min：95% A；5% B；5 min：100% B；7 min：5% B
	运行时间 9.2 min；后运行时间 3 min
	流速 0.5 mL/min
氮气温度	350 °C
干燥气流量	10 L/min
雾化器压力	55 psi
毛细管电压	+4000 V 正离子模式
	–4000 V 负离子模式

为每种药物选择并优化了两个离子对。表1列出了转换离子对、母离子（M+1；M-1）的优化碎裂电压和子离子碎片的碰撞能量。每一个序列分析要求其定量离子和定性离子的比率应在±20%以内，以满足阳性结果的判断标准。

表1. 多反应监测（MRM）transitions；优化的碎裂电压；在10 µg/mL浓度时定量分析“香料”化合物的允许离子转换范围

化合物	离子对	碎裂电压（V）	碰撞能量（eV）	极性	定量和定性离子对比率（范围）
d9-JWH-018	351.3 > 223.4	140	20	正离子	n/a
JWH-018	342.2 > 155.1	120	20	正离子	16–24
	342.2 > 214.2	120	20		
JWH-250	336.3 > 200.2	120	12	正离子	69–104
	336.3 > 188.2	120	20		
d7-JWH-073	335.3 > 207.2	120	20	正离子	n/a
JWH-073	328.2 > 155.1	120	20	正离子	60–90
	328.2 >127.1	120	35		
JWH-200	385.3 > 155.1	140	20	正离子	54–81
	385.3 > 114.2	140	25		
CP 47497 C8	331.3 > 313.3	160	25	阴离子	70–104
	331.3 > 259.3	160	35		
CP 47497	317.3 > 299.2	160	20	阴离子	75–113
	317.3 > 245.2	160	30		
HU-210	385.3 > 367.4	120	30	阴离子	13–20
	385.3 > 281.3	120	45		

标下划线的离子对用于定量；n/a= 不可用于内标

图 1 所示 10 ng/mL 浓度时化合物一级转换离子的色谱图；各化合物一级和二级离子对的比率也是在 10 ng/mL 浓度时测定的。

采集垫的回收率

制备各化合物添加浓度均为 4 和 40 ng/mL 的六个合成唾液样品。将采集垫置于上述样品液中收集 1 mL（±10%），这可以由植入采集器的蓝色体积足量指示剂来判断。然后将采集垫转移到 Quantisal 缓冲液中，加盖并放置过夜，模拟样品运输到实验室的过程。第二天取部分样品进行分析。采集垫的回收量与绝对浓度（100%）进行对比，绝对浓度系将药物加到缓冲液中，不加入采集垫室温放置过夜，然后提取和分析得到。

各化合物的采集垫提取百分回收率在 4 和 40 ng/mL（n = 6），两个浓度时均大于 60%。最高的是 4 ng/mL 时 HU-210 的回收率，达到 86%；最低的是 40 ng/mL 时 JWH-073 的回收率，只有 61%。两个浓度水平的回收率基本上一致（表 2）。

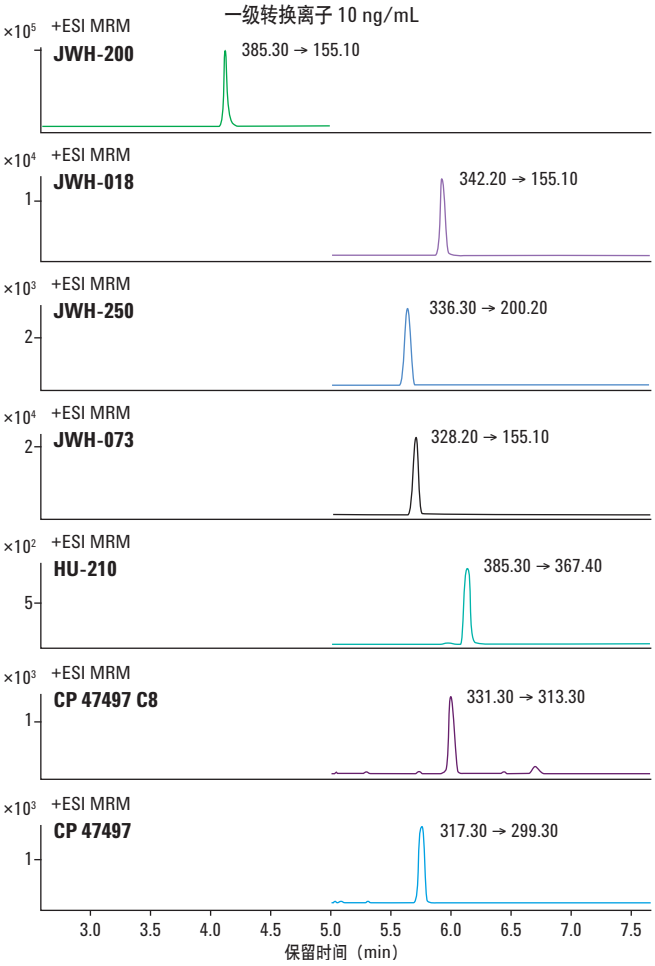


图 1. 10 ng/mL 浓度时的一级转换离子

表 2. 方法学验证数据

	JWH-018	JWH-073	JWH-200	JWH-250	CP 47497	CP 47497 C8	HU-210
LOQ（ng/mL）	0.5	0.5	0.5	2	0.5	2	5
日内误差							
4 ng/mL	3.9%	3.6%	5.0%	3.4%	4.9%	3.9%	8.6%
40 ng/mL	2.2%	2.1%	6.0%	2.0%	4.1%	4.3%	5.6%
日间误差							
4 ng/mL	8.8%	9.6%	6.2%	11%	7.7%	11%	10%
40 ng/mL	8.5%	7.9%	6.2%	11%	10%	11%	12%
采集垫回收率							
4 ng/mL	65.5%	67.4%	85.0%	66.5%	77.7%	76.0%	86.4%
40 ng/mL	70.6%	61.4%	81.4%	75.1%	71.3%	78.2%	75.7%
基质效应	-55%	-45%	-55%	-73%	-64%	-55%	-49%
处理效率	40%	51%	56%	24%	38%	45%	51%

数据分析

使用浓度范围 0.5–100 ng/mL 的线性回归分析绘制校准曲线。采用 Agilent MSD 软件计算每个浓度点中目标分析物与内标的峰面积比。数据拟合成一条线性最小二乘回归曲线，曲线未强制通过原点，且等权重。每种化合物监测了两种转换离子对用于确证分析；内标监测了一种离子对。定性离子对的比率要求在使用可接受的已知校准标准品所确定比率的 ±20% 之内。

线性和灵敏度

将溶液连续稀释到一个化合物可准确定量的最低浓度点获得方法的定量限（LOQ），即色谱峰形、保留时间（校准标准品的 2%）和定性离子对比率（± 20%）与 10 ng/mL 校准标准品测定结果比较是可以接受的。LOQ 的定量值必须在目标浓度的 ±20%以内。JWH-018、JWH-073、JWH-200 和 CP 47497 的定量限是 0.5 ng/mL；CP 47497 C8 和 JWH-250 的是 2 ng/mL；HU-210 的是 5 ng/mL（图 2）。所有化合物从 LOQ 到 100 ng/mL 浓度范围内线性关系良好（$R^2 > 0.99$；n = 5）。

基质效应

制备一个浓度为 10 ng/mL 的未经提取的药物标准品溶液，另外制备不含药物的基质提取物和阴性质控样品（提取物中只含有内标）。唾液中各化合物回收率的测定如下：首先测得浓度为 10 ng/mL 提取物（n=3）的响应 {R_{ES}}。然后提取唾液并向浓度为 10 ng/mL 的后提取物中加入药物（n=3）{R_{PES}}。通过方程式（R_{ES}/ R_{PES}）× 100 计算百分回收率。

基质效应（离子抑制）导致的响应下降通过评价未经提取的 10 ng/mL 纯药物标准品（n=3）峰面积响应来测定 {R_{NES}}。该未经提取溶液作为提取样本在相同的复溶溶剂中被分析。百分基质效应可通过公式[（R_{PES} / R_{NES}）-1] × 100 计算。总处理效率可通过公式（R_{ES} / R_{NES}）× 100 计算。

可见离子抑制效应非常明显，但是可以通过对样品进行固相萃取和使用氘代内标来限制。

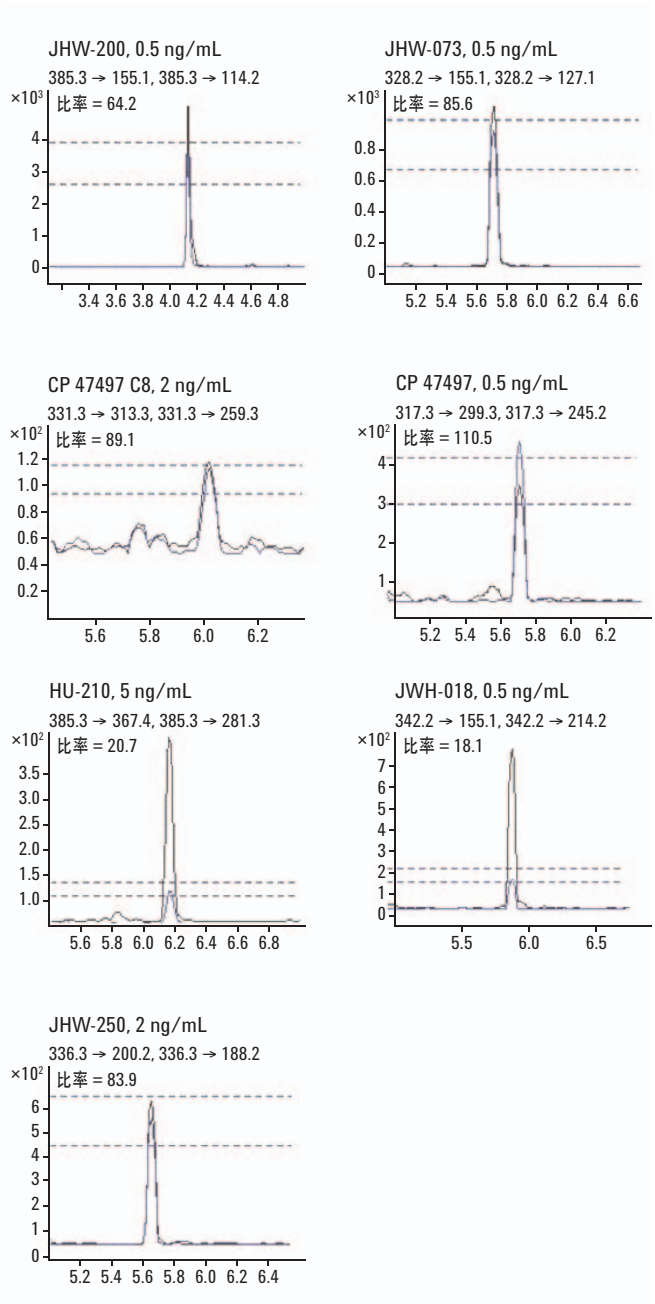


图 2. ±20% 比率的 LOQ 浓度

选择性

使用 Quantisal 装置采集了五个不含药物的唾液样本。各样本取适量按照上述步骤进行提取和分析，以考察内源性化合物或者运输用缓冲液带来的潜在干扰。

另外，在剩余的上述不含药物的唾液中加入常见的滥用药物至浓度为 2000 ng/mL，按照上述步骤提取、分析。

THC	阿米替林
THC-COOH	环苯扎林
11-OH-THC	丙咪嗪
大麻酚	度硫平
大麻二酚	多塞平
可卡因	氟西汀
苯甲酰爱康宁	舍曲林
去甲古柯碱	曲米帕明
可卡乙碱	普罗替林
可待因	氯丙嗪
吗啡	氯米帕明
6-AM	去甲替林
6-AC	帕罗西汀
羟考酮	地昔帕明
羟吗啡酮	溴西泮
氢可酮	阿普唑仑
氢吗啡酮	氯硝西泮
苯丙胺	劳拉西泮
去氧麻黄碱	奥沙西泮
MDMA	地西泮
MDA	咪达唑仑
MDEA	氟西泮
芬特明	氟硝西泮
芬太尼	去甲西泮
苯环利啶	三唑仑
曲马多	替马西泮
卡立普多	硝西泮
甲丙氨酯	氯氮卓
西酞普兰	美沙酮
文拉法辛	

不含药物提取物中未发现内源性干扰；也未发现来自常见药物的外源性干扰，如可在高浓度下被分析的 THC 及其主要代谢物。

误差

制备同时加标所有化合物的浓度为 4 ng/mL 和 40 ng/mL 的样品。每个浓度的样品连续五天（n=6；日内不精密度）按照上述步骤操作（n=30；日间不精密度）进行分析。两个浓度的所有药物检测日内误差小于 9%，日间误差小于 12%（表 2）。

真实样品

样本采自两名当地志愿者，他们曾购买了这些当时在美国仍合法的化合物。受试对象 1 吸食了“Blueberry Posh”，受试对象 2 吸食了“黑曼巴”。使用 Quantisal 唾液收集装置，采集吸食前，以及吸食后不同时间点的样本。采集受试对象 1 吸食后 20 min、40 min、1 h、2 h 和 12 h 的样本；采集受试对象 2 吸食后 20 min、40 min、1 h、5 h 和 12 h 的样本。这些样本在采集后的第二天进行分析，然后剩余样本在 4 °C 贮存一个月后用另一种方法重新分析。一年后，采用相同的程序再测定一遍。当然，现在已经没有可能获得真实样本了，因为现在拥有这些化合物已属非法行为。

两个制备物中检测到的主要活性的化合物是 JWH-018。4 °C 贮存一个月后对样本重新分析，发现目标化合物极其稳定，两次检测浓度几乎完全相同。4 °C 贮存一年后对样本重新分析，发现受试对象 1 的检测结果与一年前基本相同；受试对象 2 的样品检测后发现，那些原来浓度就很低的化合物，现在更低了（见图 3）。

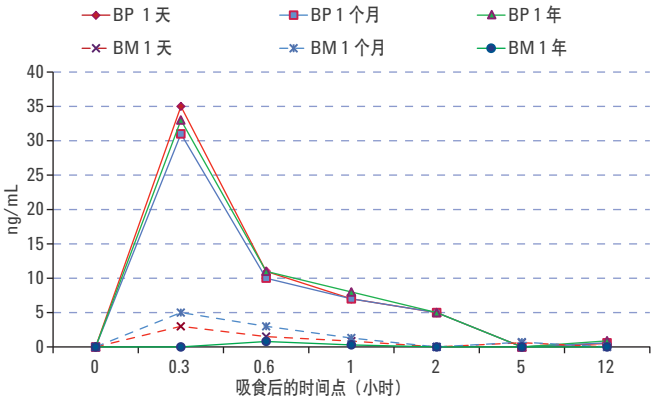


图 3. 4 °C 贮存的真实样本的稳定性

图 4 为提取离子色谱图，显示了吸食 40 min 后样本（受试对象 1）的离子对和围绕定性离子对强度 ±20% 的可接受范围；JWH-018 的浓度是 11 ng/mL。

结论

本文首次报道了唾液中多种“香料”化合物的同时测定。分析步骤适用于采用 Quantisal 装置收集的含有合成大麻素类成分样本的分析，样本中两种浓度采集垫的提取回收率均大于 60%。跟踪两种不同品牌草本产品的单次吸食过程，发现在单次吸食 20 min 后唾液中检测到最高浓度的 JWH-018。即使一年之后，单次吸食“Blueberry Posh”12 h 后的唾液样本中仍可检测到 JWH-018。

更多信息

这些数据代表典型结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

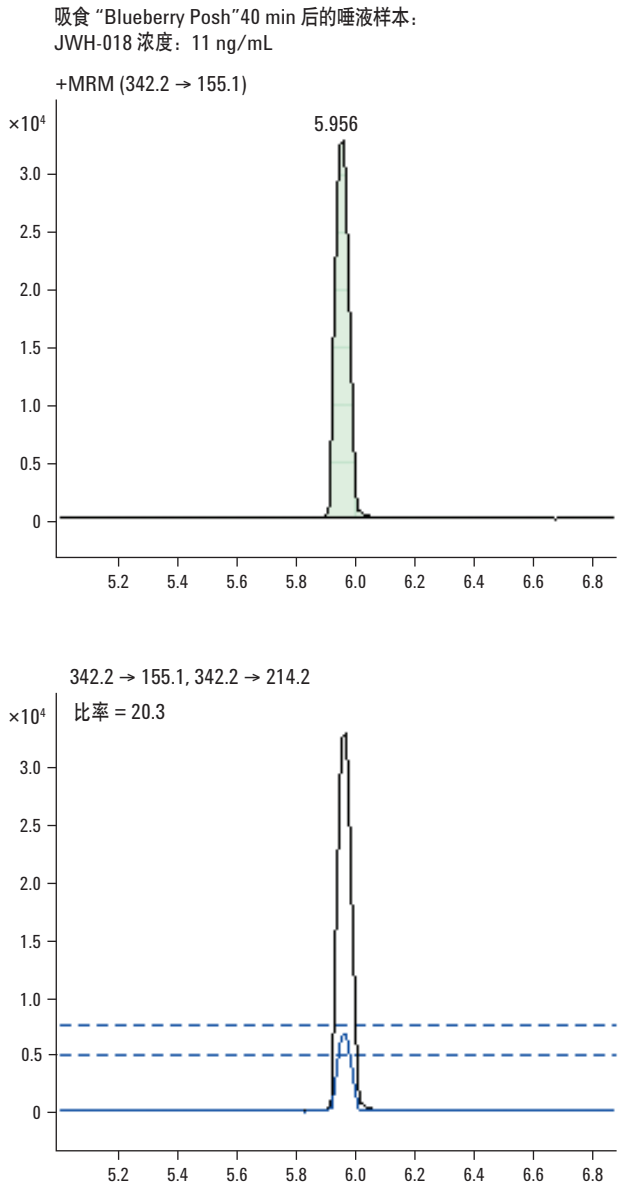


图 4. 受试对象 1 吸食 40 min 后的唾液样本；JWH-018 = 11ng/mL

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 17 日，中国印刷
5990-9679CHCN

Agilent Technologies

药物筛查和确认

检测复杂基质中的药物

尽管药物对需要用药的患者非常重要，但另一方面却逐渐成为了全世界数百万人的滥用物质。为检测这些化合物，关键是要具有痕量级的精密度和准确度。

安捷伦为气相色谱的应用提供了惰性流路，为液相色谱和其他方法提供了高度可靠的消耗品和备件。所有这些产品均可帮助您降低 LOD、提高精密度并获得更出色的信噪比响应。

了解有关支持药物筛查和确认技术的更多信息：

agilent.com/chem/forensics

返回目录

应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的 6-乙酰吗啡进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用和精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月起生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室使用 LC/MS/MS 法对初步药物检测结果进行确认。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生步骤，因此比先前使用的 GC/MS 法简便得多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的 6-乙酰吗啡的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六种简便检测方法之一，该方法主要使用安捷伦产品进行分析，包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂、Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.7 µm 表面多孔 LC 色谱柱、Agilent 1200 Infinity LC 系统以及应用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

6-乙酰吗啡或 6-单乙酰吗啡（6-AM）是海洛因特有的一种代谢物。海洛因（或二乙酰吗啡）是一种由吗啡合成的成瘾性鸦片类药物。海洛因在体内通过脱乙酰化作用迅速代谢生成 6-AM，然后再缓慢地代谢为吗啡。6-乙酰吗啡被认为是服用海洛因后，导致所有急性反应的主要成分。6-AM 可在摄入海洛因 24h 内的尿液中检出。在室温下储存的尿样中，6-AM 可以在 7 天内几乎完全水解为吗啡。在冷冻贮藏的尿液中，6-AM 被认为是相对稳定的。SAMHSA 最新规定 6-AM 的最高限量浓度为 10 ng/mL，其 10% 为检测限，即 1ng/mL。

由于 Agilent Bond Elut Plexa 独特的性质，本文所描述的简便提取方法实现了 6-AM 可重现的高回收率的提取。与其它聚合物吸附剂不同，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了与蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重现性的实现，主要得益于色谱柱填料的窄粒径分布，并且不含容易导致堵塞的细颗粒。

选用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱是由于其具有高容量和良好的分离性能。与亚 2 µm UHPLC 色谱柱相比，填充了表面多孔 2.7 µm 填料的 Poroshell 120 色谱柱可提供与其相似的柱效，但其系统背压却可降低约 40%。因此它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规 LC 系统上采用更高的流速来提高分辨率，并同时缩短分析时间和再平衡时间。

本方法在较小的样品进样体积（10 µL）和无预富集的条件下，具有极高的信噪比（样品浓度 1 ng/mL 时> 190:1，该浓度为 SAMHSA 规定限量浓度的 10%）。这得益于应用了 AJST 技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发，2010）使用的是 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品和操作步骤。

实验部分

分析物

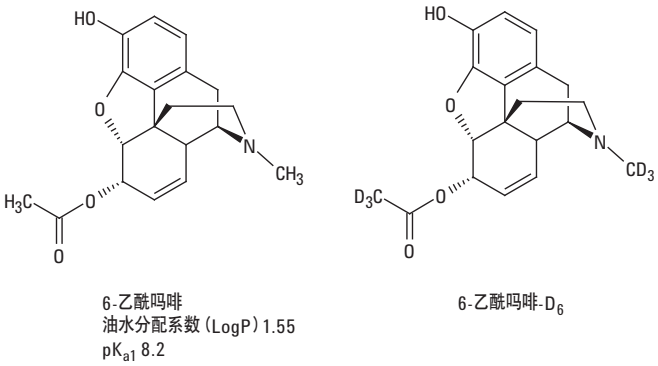


图 1. 6-乙酰吗啡分析物及其结构

药物标准品购自 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（6-乙酰吗啡）和 100 µg/mL（6-乙酰吗啡- D_6）的乙腈溶液。

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg，3 mL（部件号：12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号：12234100）
- Agilent 截止阀（部件号：12234520）
- Agilent 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号：5182-0716）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号：5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱（部件号：699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机，低延迟体积配置的 1312B 二元泵，G1367E 自动进样器，G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用安捷伦 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

预处理

往 1 mL 尿液中加入内标，使其浓度为 20 ng/mL，推荐使用 12×75 mm 玻璃试管。加入 2%甲酸 1 mL，涡旋，若溶液浑浊则离心。

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后让其自然滴出
2. 上样/加载上清液
3. 淋洗 1：1 mL 2% 甲酸溶液
4. 淋洗 2：1 mL 甲醇
5. 在真空（10–15 英寸汞柱）条件下，抽干 5-10 分钟
6. 用 1 mL 新鲜配制的甲醇：氢氧化铵（100:10）溶液洗脱，先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后用低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
7. 氮气吹干
8. 用 1 mL 初始流动相（10%甲醇、90%水、0.1%甲酸）复溶。

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1% 甲酸水溶液	
流动相 B	0.1% 甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	10
	1.5	25
	2.0	60
	2.1	90
	5.0	90
	5.1	10
停止时间	5.2 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	10 µL	
进样并洗针		
洗针	用 75: 25 甲醇：水冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数	
离子检测模式	正离子
毛细管电压	2, 800 V
干燥气流速	13 L/min
干燥气温度	350 ˚C
雾化气压力	35 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	400 ˚C
喷嘴电压	0 V
MS 参数	
扫描模式	MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.2 min-切换阀到 MS
Delta EMV (+)	400 V

结果与讨论

在酸性 pH 条件下，6-乙酰吗啡的叔胺基团质子化，从而分析物可以通过疏水保留和强阳离子交换作用被高效的保留在 Plexa PCX 聚合物吸附剂上。

100%甲醇冲洗 SPE 小柱，可去除大部分基质干扰而无 6-AM 的流失。为破坏分析物和强阳离子交换吸附剂之间的离子相互作用，将一种强碱加入到有机洗脱液中。在样品洗脱前，将 10% NH_4OH 溶液加入甲醇中，以提高 6-AM 的回收率。

Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱可实现尿液提取物中 6-AM 的快速分离，并可获得良好的峰形（如图 2 所示）。液相分离开始时采用低有机溶剂比例（10%）的流动相，从而在样品运行开始时使尿液中的盐类和其它极性成分先洗脱下来。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液（0 到 1.2 分钟），以尽量减少离子源污染。在第 1.2 分钟切换阀将液流转至质谱检测器后立即开始数据采集。0.8 mL/min 的流速可实现较短的保留时间和再平衡时间。

SAMHSA 准则要求分析目标化合物和内标物时必须使用一个定量离子和至少一个定性离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1）信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
6-AM	328.2	165.1	140	40
6-AM	328.2	211.1	140	25
6-AM	328.2	193.1	140	25
6-AM-D_6	334.2	165.1	140	40
6-AM-D_6	334.2	211.1	140	25

本方法采用 MRM 扫描模式，设置为常态而非动态检测，因为动态 MRM 模式对单一化合物的检测没有优势。

1 ng/mL 时色谱峰信噪比超过 190:1（如图 2，上图所示），显示了 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统优异的性能，能够非常可靠地检测远低于 SAMHSA 限量浓度的 6-AM（10%）。

图 3 给出了 5 个浓度水平的尿液提取标准品 6-乙酰吗啡的校准曲线。向不含有 6-乙酰吗啡的尿液中加入 6-乙酰吗啡标准品，配制成浓度分别为 1.0、10、50、200 和 400 ng/mL 的校准标准溶液。添加氘代内标 6-AM-D6 的浓度为 20 ng/mL。线性关系极为优异，$R^2 > 0.999$，表明该方法在一个较宽的动态浓度范围内呈线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的 6-AM 预加到阴性尿液中，然后进行萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用同样方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入 6-AM 标准品到 10 ng/mL，平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（即复溶溶剂），使其浓度为 10 ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

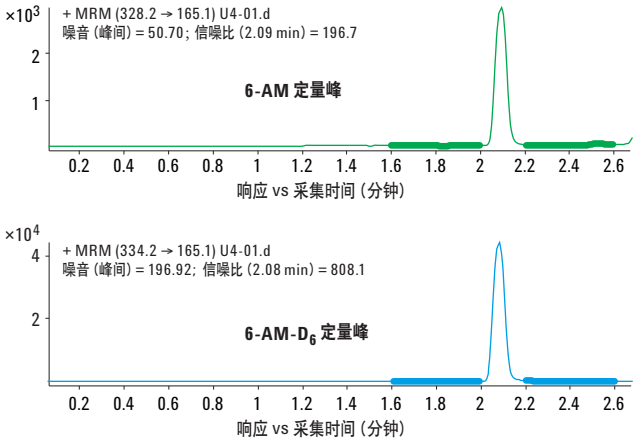


图 2. 尿液提取物中 6-AM（1 ng/mL）和 6-AM-D6 （20 ng/mL）的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱。噪声区域以加粗的形式显示

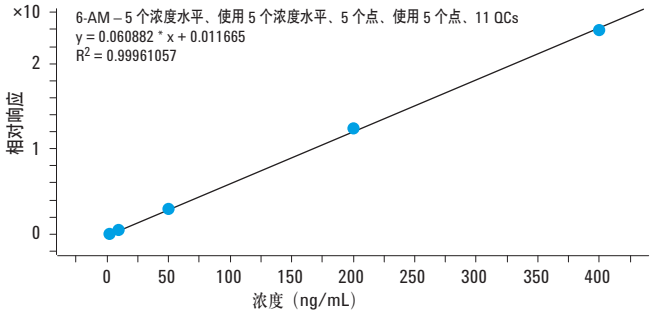


图 3. 尿液提取物中 6-AM 的校准曲线示例。校准范围为 1.0 到 400 ng/mL。线性相关系数 $R^2 > 0.999$

表 2. 6-乙酰吗啡分析方法评价，n = 5

	%
处理效率 *	83
萃取回收率 *	83
基质效应 *	100
准确度 **	106
精密度 (CV)**	0.6

* 限量浓度条件下测定　** 限量浓度的 40%条件下测定

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的提取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得的。

表 2 显示了 6-乙酰吗啡较高的提取回收率（83%）和良好的准确度（106%）以及精密度（0.6%）。100%的基质效应表明无基质干扰导致的信号增强或抑制，因此可确定经 Plexa 处理的提取物非常纯净。

结论

这里描述的固相萃取样品制备和 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全遵循 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高精密度、准确度和重现性的有法律效力的数据结果。其硬件配置与 2011 版 SAMHSA 方法中的相同均来自安捷伦。这些方法特别为所有安捷伦 1100 和安捷伦 1200 LC 系列的用户开发，这些 LC 系统的背压均不超过 400 bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，离子源参数可以很容易地修改。安捷伦科技可提供电子版本的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

参考文献

1. Anon (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/
2. R. Baselt (2008) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man.* 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. J. Hughes and P. Moorman (2011) “Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing”. Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem/cn.
4. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng (2003) “Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS”. *Analytical Chemistry*, 75: 3019-3030.
5. P. Moorman and J. Hughes (2010) “6-Acetylmorphine in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS)”. SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5857EN.
6. E. Rook, A. Huitema, W. van den Brink, J. van Ree, and J. Beijnen (2006) “Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature”. *Current Clinical Pharmacology*, 1: 109-118.
7. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.
8. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller (2009) “A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples for morphine, codeine, 6-acetylmorphine, and benzoylecgonine”. *Journal of Analytical Toxicology,* 33: 398-408.

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

©安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 10 日，中国印刷
5990-9622CHCN

Agilent Technologies

应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯丙胺类药物进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用与精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室采用 LC/MS/MS 法确认初步药物测试结果。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生步骤，因此它远比以前应用的 GC/MS 法要简便的多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的 5 种苯丙胺类药物的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六种简便检测方法之一，该方法主要使用安捷伦产品进行分析，包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂，Agilent Poroshell 120 EC-C18，2.7µm 表面多孔 LC 色谱柱，Agilent 1200 Infinity LC 系统以及应用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

苯丙胺类药物属于拟交感神经胺类化合物，是很强的神经兴奋剂，其功效和作用类似于内源性神经递质，如肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺。苯丙胺类成分是在草麻黄叶子中发现的（例如麻黄碱），并且于 19 世纪末第一次被合成出来。它们化学结构的特征是具有一个苯乙胺骨架，α碳上连着一个甲基，还有其它的一些取代基团（如图 1 所示）。很大一部分苯丙胺类化合物以原型药物形式从尿液中排出。通过去甲基化作用，较复杂的苯丙胺类衍生物被代谢为较简单的结构，例如甲基苯丙胺代谢为苯丙胺，MDMA 代谢为 MDA。除了苯丙胺类药物，还有许多其它种类的药物会在人体内代谢成甲基苯丙胺和苯丙胺类物质，这就是所谓的苯丙胺类生成药物或苯丙胺前体化合物，例如安非他尼、氯苄苯丙胺、芬乙茶碱和丙炔苯丙胺等。2011 版的 SAMHSA 准则要求对 5 种苯丙胺类药物进行筛选并确认，分别是苯丙胺、甲基苯丙胺、MDA、MDMA 和 MDEA。所用分析方法应具备使这些药物与其结构类似物相区分的能力，以确保避免潜在的干扰，这些干扰物包括麻黄碱、伪麻黄碱、芬特明和苯丙醇胺（即 PPA 或去甲麻黄碱）等。

在检测苯丙胺类药物的传统 GC/MS 法中，通常用高碘酸预处理来氧化羟基苯乙胺类成分如麻黄碱和伪麻黄碱，以排除此类化合物的干扰。我们取消了这一步骤，而是依据最新 SAMHSA 准则中所要求的对所有目标分析物实现了可靠的色谱分离。

新的 SAMHSA 准则规定苯丙胺类药物的最高限量浓度为 250 ng/mL，检测限为限量浓度的 10%，即 25 ng/mL。由于预计在一些尿样中可能出现高浓度苯丙胺类药物（如同阿片类药物），我们选择使用更高容量的 3 mm id Agilent Poroshell 120 色谱柱代替所有以前安捷伦 SAMHSA 方法中的 2 mm id 色谱柱。与亚 2 µm 的 UHPLC 色谱柱相比，填充了 2.7 µm 表面多孔颗粒的 Poroshell 120 色谱柱具有与其类似的柱效，但其背压却减少了 40%左右。因此，它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规液相色谱系统上通过使用更高的流速来提高分辨率，同时缩短分析时间和再平衡时间。

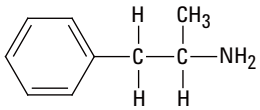
由于 Agilent Bond Elut Plexa 的独特性质，本文所描述的提取方法获得了苯丙胺类药物极高的回收率，且重复性好。不像其它聚合物吸附剂，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重复性的实现，主要得益于色谱柱填料的窄粒径分布，并且不含易引起堵塞的细颗粒。

在较小的样品进样体积（2 µL）和无预富集的条件下，该方法获得了极好的信噪比（样品浓度 25ng/mL 时>400:1，该浓度只有 SAMHSA 规定限量浓度的 10%），这得益于应用了 AJST 技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

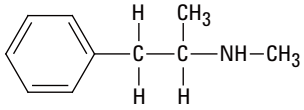
安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发，2010）采用的是 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品和操作步骤。

实验部分

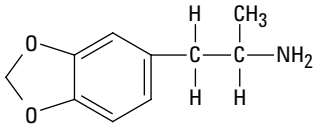
分析物



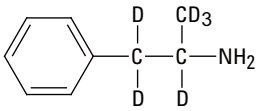
苯丙胺
Log P 1.79 pKa 9.8



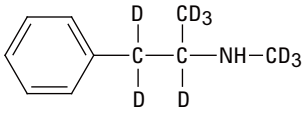
甲基苯丙胺
Log P 1.94 pKa 9.5



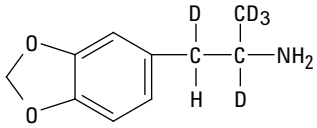
MDA
Log P 1.67 pKa 9.7



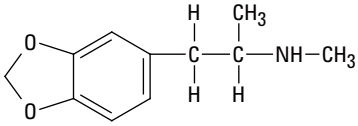
苯丙胺-D_6



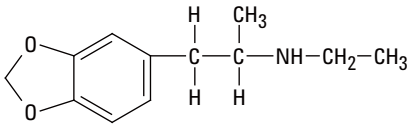
甲基苯丙胺-D_9



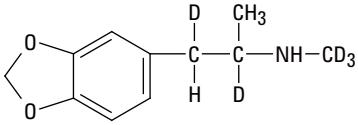
MDA-D_5



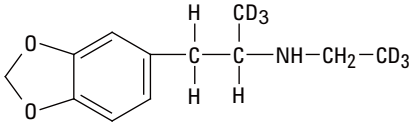
MDMA
Log P 2.05 pKa 9.9



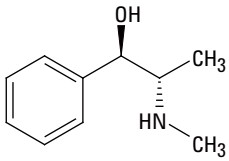
MDEA
Log P 2.34 pKa 9.9



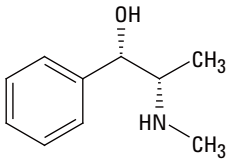
MDMA-D_5



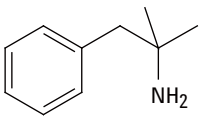
MDEA-D_6



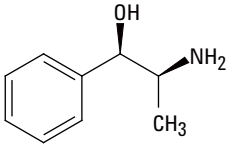
麻黄碱
Log P 1.13 pKa 9.6



伪麻黄碱
Log P 0.89/1.1 pKa 9.9



芬特明
Log P 2.16 pKa 10.1



苯乙醇胺
Log P 0.81 pKa 9.4

图 1. 苯丙胺类药物与其干扰物及这些分析物的结构

药物标准品购自 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（苯丙胺、甲基苯丙胺、MDA、MDMA、MDEA、麻黄碱、伪麻黄碱、芬特明和苯丙醇胺）和 100 µg/mL（苯丙胺-D_6、甲基苯丙胺-D_9、MDA-D_5、MDMA-D_5 和 MDEA-D_6）的甲醇溶液。

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg, 3 mL（部件号 12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号 12234100）
- Agilent 截止阀（部件号 12234520）
- Agilent 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号 5182-0716）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号 5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱(部件号 699975-302)
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机，低延迟体积配置的 1312B 二元泵，G1367E 自动进样器，G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用安捷伦 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

预处理

往 0.5 mL 尿液中加入各内标物，使浓度均为 500 ng/mL，推荐使用 12 × 75 mm 玻璃试管。加入 1 mL 2%甲酸溶液，涡旋，若溶液浑浊则离心。

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后使其自然滴出
2. 上样/加载上清液
3. 淋洗 1: 1 mL 2%甲酸溶液
4. 淋洗 2: 1 mL 甲醇
5. 在真空（10–15 英寸汞柱）条件下，抽干 5-10 分钟
6. 用 1 mL 新鲜配制的乙酸乙酯：甲醇：氢氧化铵（50:50:20）溶液洗脱。先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后用低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
7. 在低于 37 °C 条件下用氮气将洗脱液吹干至 0.2 mL
8. 在洗脱液中加入 100 µL 0.025 M 盐酸溶液，涡旋
9. 蒸干
10. 用 0.5 mL 初始流动相（15%甲醇，85%水和 0.1%甲酸）复溶 。

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1%甲酸水溶液	
流动相 B	0.1%甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	15
	1.5	15
	3.5	30
	3.6	90
	6.6	90
	6.7	15
停止时间	6.8 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	2 µL	
进样并洗针		
洗针	用 75: 25 甲醇: 水冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数	
离子检测模式	正离子
毛细管电压	4,000 V
干燥气流速	10 L/min
干燥气温度	350 °C
雾化气压力	35 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	400 °C
喷嘴电压	0 V
MS 参数	
扫描类型	MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 0.6 min （干扰物分离）或 1.2 min（仅 5 种苯丙胺类药物） –切换阀到 MS
Delta EMV (+)	200 V

结果与讨论

在酸性 pH 条件下，苯丙胺类药物的氨基基团质子化，从而分析物可以通过疏水作用和强阳离子交换作用被高效的保留在 Plexa PCX 聚合物吸附剂上。

用 100%甲醇淋洗可消除大部分的基质干扰，但吸附剂上的分析物没有损失。为了打破苯丙胺类药物与强阳离子吸附剂之间的离子相互作用，在有机洗脱液中添加了一种强碱。在进行样品洗脱之前，将 20% 氢氧化铵溶液添加到组成为 50%乙酸乙酯和 50%甲醇的双组分洗脱剂中，以提高回收率。

苯丙胺类药物易挥发，并且容易在样品制备过程中随溶剂的蒸发而损失，除非加入盐酸将其以盐的形式沉淀。最好在蒸发即将结束时加入 HCl，以避免形成会造成离子抑制的氯化铵盐。

图 2 显示了采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18，3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱可出色地实现 5 种苯丙胺类药物与 SAMHSA 规定的潜在干扰物的分离，并且分析可在 3.2 min 内完成。液相色谱分离首先采用低有机溶剂比例（15%）的流动相，使尿液中的盐类和其它极性成分在样品运行开始时先被洗脱。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液，以尽量减少离子源污染。切换阀将液流转至质谱检测器后即刻开始数据采集。0.8 mL/min 的流速可获得较短的分析时间和再平衡时间。

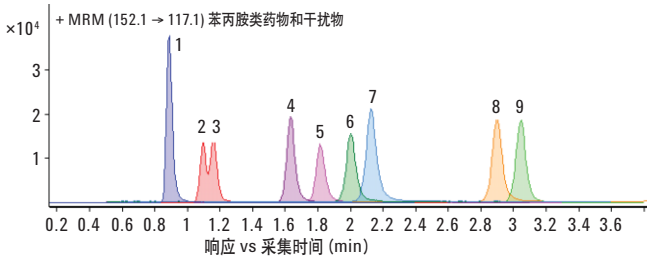


图 2. 苯丙胺类药物与其潜在干扰物在 Agilent Poroshell 120 EC-C18，3×50mm，2.7 µm 色谱柱上分离的叠加 MRM 提取离子色谱图。每个分析物的浓度均为 50 ng/mL。色谱峰按洗脱顺序分别为: 1. 苯丙醇胺；2. 麻黄碱；3. 伪麻黄碱；4. 苯丙胺；5. 甲基苯丙胺；6. MDA；7. MDMA；8. MDEA；9. 芬特明

进行多种化合物分析时，推荐使用利用一个特定转换离子，通过保留时间和 ΔRT（时间窗）调整的动态 MRM 方法。当确定干扰组分可以完全分离出去时，我们就可以只关注五种苯丙胺类药物的数据采集，此时可在 1.2 min 而非 0.6 min（MS 方法的第 1 个时间段）将切换阀从废液瓶转向 MS 检测器。

SAMHSA 准则要求分析目标化合物和内标物时必须使用一个定量离子和至少一个定性离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1)信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物名称	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
苯丙胺	136.1	119.1	64	4
苯丙胺	136.1	91.1	64	14
苯丙胺-D_6	142.1	125.1	66	5
苯丙胺-D_6	142.1	93.1	66	13
MDA	180.1	163.1	92	5
MDA	180.1	105.1	92	17
MDA-D_5	185.1	168.1	68	5
MDA-D_5	185.1	110.1	68	21
MDEA	208.1	163.1	88	8
MDEA	208.1	133.1	88	17
MDEA	208.1	105.1	88	21
MDEA-D_6	214.2	166.1	90	8
MDEA-D_6	214.2	108.1	90	25
MDMA	194.1	163.1	84	5
MDMA	194.1	135.1	84	17
MDMA	194.1	105.1	84	21
MDMA-D_5	199.1	165.1	82	4
MDMA-D_5	199.1	107.1	82	25
甲基苯丙胺	150.1	119.1	80	4
甲基苯丙胺	150.1	91.1	80	16
甲基苯丙胺-D_9	159.2	125.2	77	5
甲基苯丙胺-D_9	159.2	93.1	77	13
麻黄碱-伪麻黄碱	166.1	133.1	80	21
芬特明	150.1	133.1	80	6
苯丙醇胺	152.1	117.1	80	20

5 种苯丙胺类药物的定量色谱峰在样品浓度为 25 ng/mL 时获得的信噪比均超过 400: 1（如图 3，上图所示。图中标注了 MDEA 定量色谱峰的 S/N 值）。这说明了 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能，能够非常可靠地检测远低于 SAMHSA 限量浓度的 5 种苯丙胺类药物。

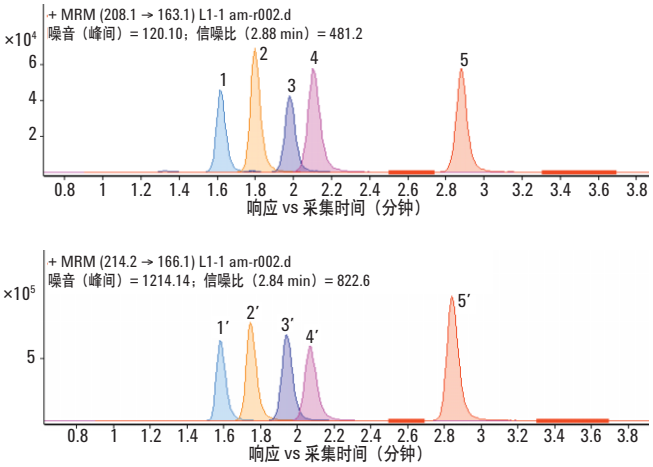


图 3. 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50mm，2.7 µm 色谱柱分析尿液提取物中的苯丙胺类药物（25 ng/mL）与各内标物（500ng/mL）的定量峰重叠 MRM 提取离子色谱图。色谱峰按洗脱顺序分别为：上图：1. 苯丙胺；2. 甲基苯丙胺；3. MDA；4. MDMA；5. MDEA，下图：1′. 苯丙胺-D6；2′. 甲基苯丙胺-D9；3′. MDA-D_5；4′. MDMA-D_5；5′. MDEA-D_6。噪声区域以加粗的形式显示

图 4 给出了 5 个浓度水平的尿液提取物中标准品的校准曲线。通过分别向阴性尿液中加入各苯丙胺类药物标准品，制备浓度分别为 25、250、1000、5000 和 10,000 ng/mL 的一系列校准标准溶液。每种分析物的氘代内标浓度为 500 ng/mL。各曲线优异的线性关系（$R^2 > 0.999$）表明该方法在很宽的动态浓度范围内呈线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

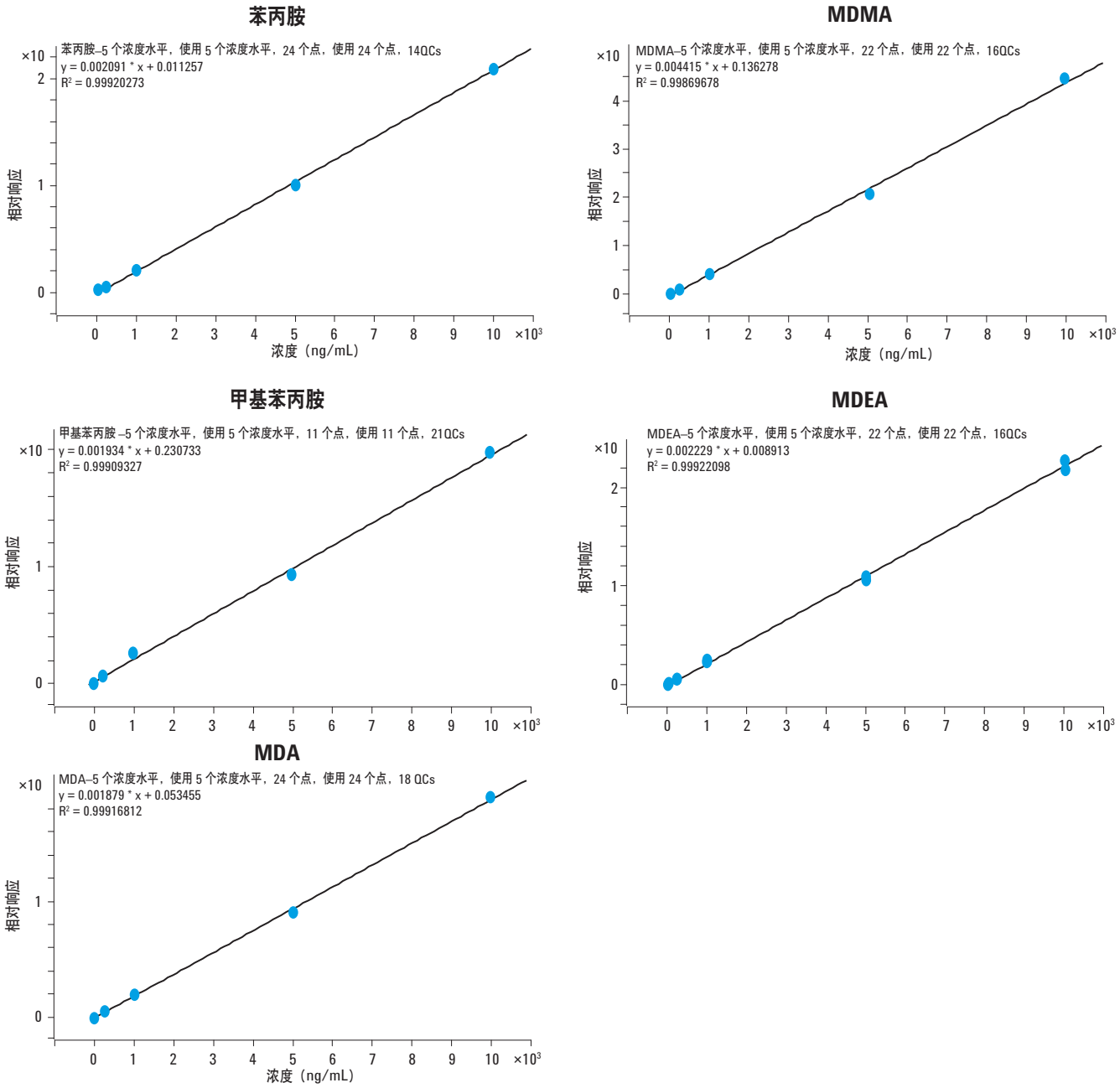


图 4. 尿液提取物中五种苯丙胺类药物的校准曲线示例。浓度范围从 25 到 10,000 ng/mL。线性相关系数 $R^2 > 0.999$

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的五种苯丙胺类药物预加到阴性尿液中，然后进行 SPE 萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用相同的方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入五种苯丙胺类药物标准品到 250 ng/mL（固相萃取后加标），平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（即复溶溶剂），使其浓度为 250 ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。 萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的提取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得的。

表 2 显示五种苯丙胺类药物的萃取回收率均大于等于 94%，五种分析物中的四种处理效率高于 90%；只有苯丙胺的处理效率是 86%。较高的基质效应（91-99%）表明只有 1-9%的信号由于离子抑制作用而损失。从而证明了经 Plexa 处理的提取物纯净度极高。同时该方法具有极高的准确度（目标物浓度的±10%以内）和极好的精密度（CV < 1.1%）。

结论

本文所描述的固相萃取样品制备与 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全遵循 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高精密度、准确度和重现性的有法律效力的数据结果。其 硬件配置与 2011 版 SAMHSA 方法中的相同均来自安捷伦。这些方法特别为安捷伦 1100 和安捷伦 1200 LC 系列的所有用户开发，这些 LC 系统的背压均不超过 400 bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，离子源参数可以很容易地修改。安捷伦科技可提供电子版本的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

表 2. 分析方法评价，n = 5

参数	苯丙胺	甲基苯丙胺	MDA	MDMA	MDEA
处理效率 * (%)	86	93	91	93	95
萃取回收率 * (%)	94	94	95	97	96
基质效应 * (%)	91	99	95	96	98
准确度 ** (%)	107	105	92	101	106
精密度 (CV)**(%)	0.6	0.5	1.1	0.5	0.3

* 限量浓度条件下测定

** 苯丙胺 、MDA、MDMA 和 MDEA 在限量浓度的 40%条件下测定 ，甲基苯丙胺在限量浓度条件下测定

参考文献

1. Anon (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/
2. R. Baselt, (2008) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man.* 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. J. Hughes, and P. Moorman, (2011) "Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing". Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem.
4. B. K. Matuszewski, M. L.Constanzer, and C. M. Chavez-Eng, (2003) "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS". *Analytical Chemistry*, 75: 3019-3030.
5. P. Moorman and J. Hughes, (2010) "Amphetamines (expanded) in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS)". SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5865EN.
6. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.
7. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller, (2010) "A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples II: amphetamine, methamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyethylamphetamine, phencyclidine, and (±)-11-nor-9-carboxy-Δ9 – tetrahydrocannabinol". *Journal of Analytical Toxicology*, 34: 430-443.

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

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（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 13 日，中国印刷
5990-9623CHCN

Agilent Technologies

应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 和 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯甲酰爱康宁进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用与精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室采用 LC/MS/MS 法确认初步药物测试结果。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生步骤，因此它远比以前应用的 GC/MS 法要简便的多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的苯甲酰爱康宁的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六种简便检测方法之一，该方法主要使用安捷伦产品进行分析，包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂，Agilent Poroshell 120 EC-C18，2.7µm 表面多孔 LC 色谱柱，Agilent 1200 Infinity LC 系统以及采用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

苯甲酰爱康宁（BE）是可卡因存在于尿液中的一种主要代谢产物，可卡因是强烈的具有成瘾性的神经系统兴奋剂和局部麻醉剂。可卡因可在酶催化下水解为苯甲酰爱康宁（发生在肝脏），也可以不经过酶催化，而在碱性 pH 条件下生成苯甲酰爱康宁（Anon.，2011）。苯甲酰爱康宁可在摄入可卡因后的几天内在尿液中检出。在冷冻贮藏的尿样中苯甲酰爱康宁相对稳定，而在较高温度和碱性条件下，它能进一步发生水解。SAMHSA 规定苯甲酰爱康宁的最高限量浓度为 100 ng/mL，其检测限为限量浓度的 10%，即 10 ng/mL。

由于 Agilent Bond Elut Plexa 吸附剂的独特性质，本文所描述的提取方法实现了对苯甲酰爱康宁萃取的高回收率提取，且重复性好。不像其它聚合物吸附剂，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重现性的实现，主要得益于 Plexa 柱填料的窄粒径分布，并且不存在容易导致堵塞的细颗粒。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18，3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱是由于其具有较高的载样量和极佳的分离性能。填充表面多孔 2.7 µm 颗粒的 Poroshell 120 色谱柱能提供与亚 2 µm UHPLC 色谱柱类似的柱效，但其背压却减少了约 40%。因此，它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规液相系统上采用较高的流速来提高分辨率，并同时缩短分析时间和再平衡的时间。

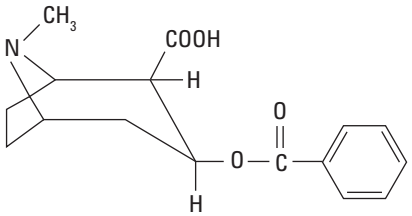
在较小的样品进样体积（2 µL）且无样品预富集的条件下，该方法具有极佳的信噪比（样品浓度 10 ng/mL 时>400:1，此浓度是 SAMHSA 规定限量浓度的 10%），这得益于采用了 AJST 技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发, 2010）采用的是 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品和操作步骤。

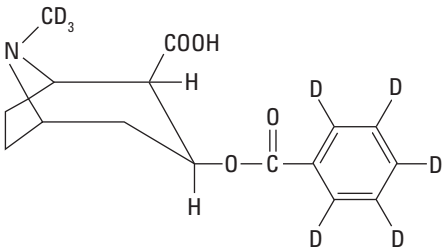
实验部分

分析物

药物标准品购自 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（苯甲酰爱康宁）和 100 µg/mL（苯甲酰爱康宁-D_8）的甲醇溶液。



苯甲酰爱康宁
Log P（预测值）-0.73–2.26
pK_{a1} 10.1



苯甲酰爱康宁-D_8

图 1. 苯甲酰爱康宁分析物及其化学结构。log P 预测值来自 DrugBank, ChemSpider, PubChem

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg，3 mL（部件号 12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号 12234100）
- Agilent 截止阀（部件号 12234520）
- Agilent 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号 5182-0716）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号 5182-0717）

SPE

- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱（部件号 699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机，低延迟体积配置的 1312B 二元泵，G1367E 自动进样器，G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

预处理

往 1 mL 尿液中加入内标，使其浓度为 200 ng/mL；推荐使用 12 x 75 mm 玻璃试管。加入 1 mL 2%甲酸溶液，涡旋，如溶液浑浊则离心。

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后使其自然滴出
2. 上样或加载上清液
3. 淋洗 1：1 mL 2%甲酸溶液
4. 淋洗 2：1 mL 甲醇
5. 在真空（10–15 英寸汞柱）条件下，抽干 5–10 分钟
6. 用 1 mL 新鲜配制的甲醇: 氢氧化铵（100: 20）溶液洗脱。先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后用低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
7. 氮气吹干
8. 用 1 mL 初始流动相（10%甲醇，90%水，0.1%甲酸）复溶

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1%甲酸水溶液	
流动相 B	0.1%甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	10
	0.5	10
	2.5	70
	2.51	90
	5.5	90
	5.51	10
停止时间	5.6 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	2 µL	
进样并洗针		
洗针	用 75: 25 甲醇：水溶液冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数	
离子检测模式	正离子
毛细管电压	3,000 V
干燥气流速	10 L/min
干燥气温度	350 °C
雾化气压力	35 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	400 °C
喷嘴电压	0 V
MS 参数	
扫描类型	MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.2 min-切换阀到 MS
Delta EMV(+)	200 V

结果与讨论

在酸性 pH 条件下，苯甲酰爱康宁的叔胺基团质子化，从而分析物可以通过疏水保留与强阳离子交换作用被高效的保留在 Plexa PCX 聚合物吸附剂上。

用 100%甲醇淋洗 SPE 小柱能消除大部分的基质干扰，同时不会造成 BE 损失。向有机洗脱液中添加一种强碱，目的是破坏分析物和强阳离子交换吸附剂间的离子相互作用。在样品洗脱前，将 20% NH_4OH 溶液加到甲醇中，以提高苯甲酰爱康宁的回收率。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18，3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱能实现尿液萃取物中苯甲酰爱康宁的快速分离，并可获得极佳的峰形（如图 2 所示）。液相色谱分离首先采用低有机溶剂比例（10%）的流动相，从而使尿液中的盐类和其它极性成分在样品运行开始时先被洗脱。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液（0 到 1.2 分钟），使离子源污染最小化。在第 1.2 分钟时切换阀将液流转至质谱检测器后立即开始数据采集。流速 0.8 mL/min 条件下，可获得较短的分析时间和再平衡时间。

浓度为 10 ng/mL 时，色谱峰的信噪比>400:1（如图 2，上图所示）。这表明 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能，能够可靠地检测远低于 SAMHSA 规定限量浓度的苯甲酰爱康宁（10%）。

SAMHSA 法规要求分析目标分析物和内标物时必须监测一个定量离子和至少一个定性的离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1）信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
BE	290.1	168.1	90	15
BE	290.1	105.1	90	30
BE	290.1	82.1	90	32
BE-D_5	298.2	171.1	90	15
BE-D_5	298.2	110.1	90	30

图 3 是五个浓度水平的尿液萃取物中苯甲酰爱康宁标准品的校准曲线。通过向阴性尿液中加入苯甲酰爱康宁标准品，制备浓度分别为 10、100、500、1000 和 4000 ng/mL 的 BE 系列校准标准溶液。添加氘代内标物 BE-D_8 的浓度为 200 ng/mL。线性关系极为优异，线性相关系数 R^2 = 0.998 证明本方法在一个较宽的动态浓度范围内具有极佳的线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

本方法采用 MRM 扫描模式，设置为常态而非动态检测，因为动态 MRM 模式对单一化合物的检测没有优势。

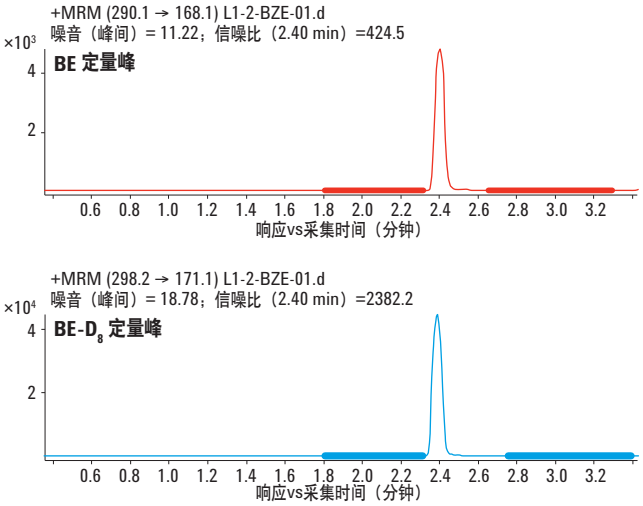


图 2. 尿液萃取物中 BE（10 ng/mL）和 BE-D_8（200 ng/mL）的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18，3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱。噪声区域以加粗的形式显示

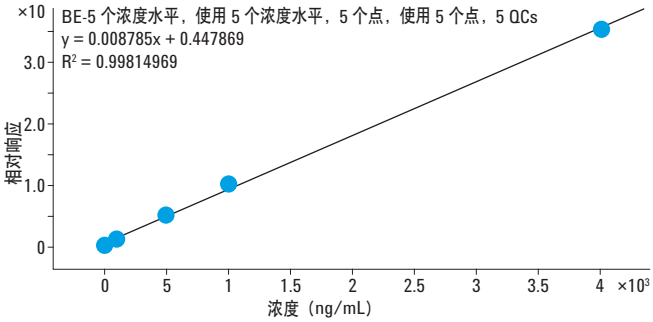


图 3. 尿液萃取物中苯甲酰爱康宁的校准曲线示例。校准浓度范围 10 到 4000 ng/mL，线性相关系数 R^2 = 0.998

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的 BE 预加到阴性尿液中，然后进行萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用同样方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入苯甲酰爱康宁至 100 ng/mL，平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（即复溶溶剂），使其浓度为 100ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。 萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的提取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。

准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得。

表 2 数据表明本方法分析苯甲酰爱康宁具有较高的萃取回收率（86%），同时也获得了极佳的准确度（102%）和精密度（0.7%）。99%的基质效应表明只有 1%的信号因基质干扰引起的微弱离子抑制作用而损失，从而证明了经 Plexa 吸附剂处理的提取物具有优异的纯净度。

表 2. 在限量浓度条件下进行方法评价，n = 5

	%
处理效率 *	85
萃取回收率 *	86
基质效应 *	99
准确度 **	102
精密度 **（CV）	0.7

* 在限量浓度条件下测定
** 在 40%限量浓度条件下测定

结论

本文所描述的固相萃取样品制备与 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全符合 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高准确度、高精密度、高重现性的有法律效力的数据结果。其硬件配置与 2011 版 SAMHSA 方法中的相同均来自安捷伦。这些方法特别为安捷伦 1100 和安捷伦 1200 LC 系列的所有用户开发，这些 LC 系统的最高背压均不超过 400bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，离子源参数可以很容易地进行修改。安捷伦科技可提供电子版本的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

参考文献

1. Anon. (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/
2. R. Baselt (2008) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. K. E. Billings (2003) "Development of a Simple Method to Detect and Quantify Benzoylecgonine, a Cocaine Metabolite, in Urine". Honors Projects. Paper 5. Illinois Wesleyan University. http://digitalcommons.iwu.edu/chem_honproj/5
4. J. Hughes and P. Moorman (2011) "Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing". Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem/cn.
5. P. M. Jeanville, E. S. Estapé, S. R. Needham, and M. J. Cole (2000) "Rapid confirmation/quantitation of cocaine and benzoylecgonine in urine utilizing high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11 (3): 257-263.
6. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng (2003) "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS". *Analytical Chemistry*, 75: 3019-3030.
7. P. Moorman and J. Hughes (2010) "Benzoylecgonine in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS)". SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5866EN.
8. SAMHSA (2010) "Manual for Urine Laboratories", National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.
9. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller (2009) "A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples for morphine, codeine, 6-acetylmorphine, and benzoylecgonine". *Journal of Analytical Toxicology*, 33: 398-408.

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

©安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012 年 1 月 10 日，中国印刷
5990-9624CHCN

Agilent Technologies

应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 与 Agilent Poroshell 120 对尿液中的阿片类药物（吗啡和可待因）进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用与精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室采用 LC/MS/MS 法确认初步药物测试结果。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生步骤，因此它远比以前应用的 GC/MS 法要简便的多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的阿片类药物的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六种简便检测方法之一，该方法主要使用安捷伦产品进行分析，包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 柱，Agilent Poroshell 120 EC-C18，2.7 µm 表面多孔 LC 色谱柱，Agilent 1200 Infinity LC 系统以及应用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

阿片类药物（吗啡和可待因）是在罂粟树脂中发现的天然生物碱。可待因是目前世界上使用最广泛的阿片类药物。除了吗啡和可待因的检测，SAMHSA 准则还要求该分析方法应具备使这些药物与其结构类似化合物分离的能力，这些结构类似化合物包括半合成的阿片类药物：氢吗啡酮、羟吗啡酮、氢可酮、羟考酮和可待因的代谢产物去甲可待因。所有这些药物均可与人类的阿片受体结合发挥作用。除了作为止痛处方药使用外，它们还用于娱乐用途，并且可导致阿片类药物依赖，高剂量的阿片类药物/鸦片可导致呼吸衰竭而致人死亡。

吗啡和可待因在体内均可广泛代谢。吗啡主要代谢为吗啡-3-葡萄糖苷酸和吗啡-6-葡萄糖苷酸。可待因的主要代谢产物是吗啡、可待因-6-葡萄糖苷酸和去甲可待因。由于在尿液中发现的吗啡和可待因均主要以葡萄糖苷酸缀合物的形式存在，因此 SAMHSA 要求测定每一种化合物的总浓度。分析前必须将葡萄糖苷酸缀合物完全转换为母体药物。确保游离的阿片类药物完全转化的最可靠的转换方法是酸水解。过去常用的酶解法已被证实不能使母体化合物转换完全，这可能会导致假阴性的结果（Wang 等，2006）。

SAMHSA 规定吗啡和可待因的最高限量浓度为 2000 ng/mL。由于预计在一些尿样中可能出现高浓度的阿片类药物（还有安非他明），我们选择使用更高容量的 3mm id Agilent Poroshell 120 色谱柱代替所有以前安捷伦 SAMHSA 方法中的 2mm id 色谱柱。与亚 2 µm 的 UHPLC 色谱柱相比，填充了 2.7 µm 表面多孔颗粒的 Poroshell 120 色谱柱具有与其相似的柱效，但其背压却减少了 40%左右。因此，它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规 LC 系统上通过使用更高的流速来提高分辨率，同时缩短分析时间和再平衡时间。

由于 Agilent Bond Elut Plexa 的独特性质，本文所描述的提取方法获得了吗啡和可待因极高的回收率，且重复性好。不像其它聚合物吸附剂，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重复性的实现，主要得益于色谱柱填料的窄粒径分布，并且不含易引起堵塞的细颗粒。

在较小的样品进样体积（2 µL）和无预富集的条件下，该方法对吗啡和可待因均获得了极佳的信噪比（样品浓度 200 ng/mL 时 >150:1，该浓度为 SAMHSA 规定限量浓度的 10%），这得益于应用了 AJST 技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发，2010）采用了 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品及操作步骤。

实验部分

分析物

药物标准品购自 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（吗啡、可待因、氢吗啡酮、去甲可待因、氢可酮、羟考酮、羟吗啡酮和吗啡 3 -葡萄糖苷酸）和 100 µg/mL（吗啡-D_6 和可待因-D_6）的甲醇溶液。

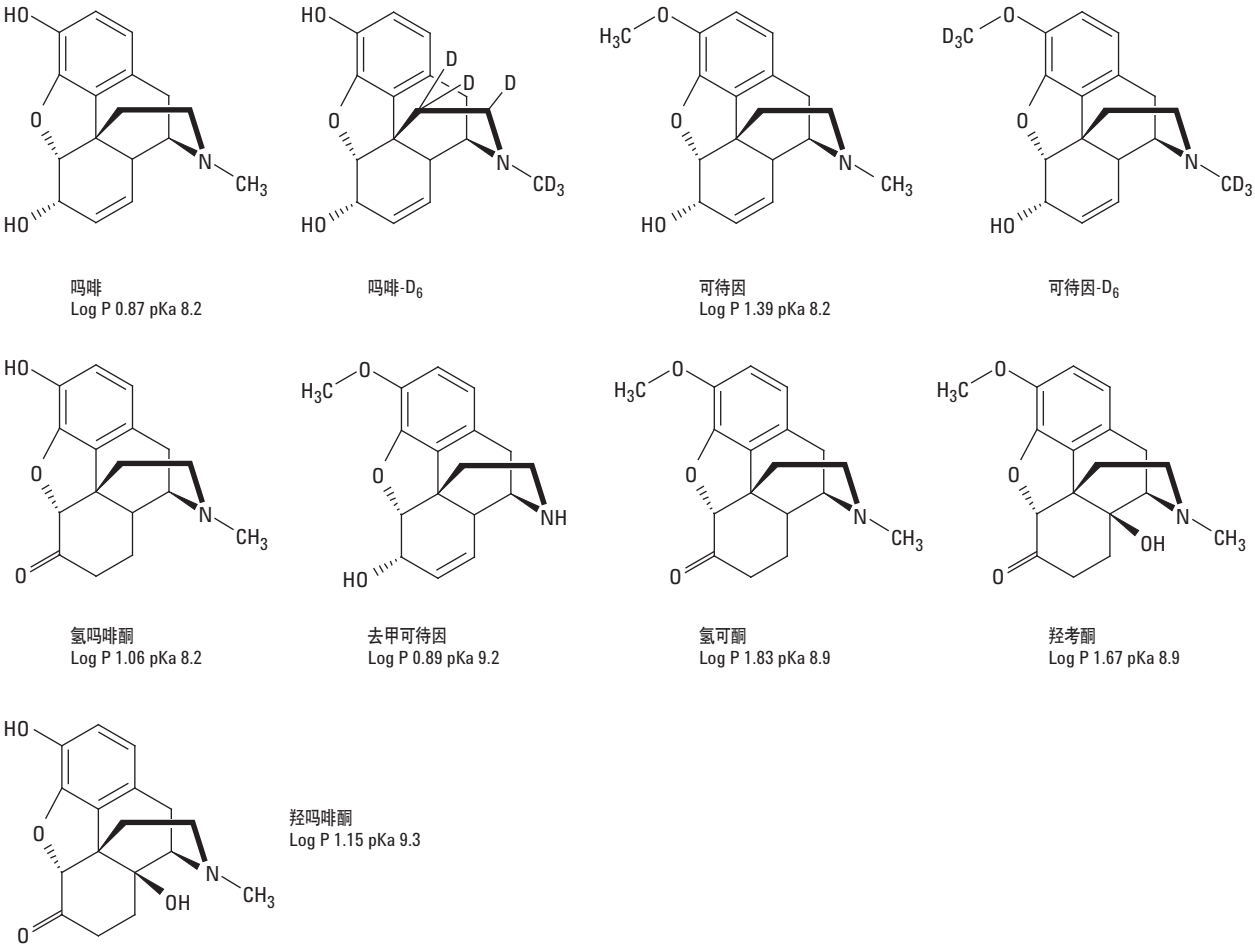


图 1. 阿片类分析物及其结构

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg，3 mL（部件号 12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号 12234100）
- Agilent 截止阀（部件号 12234520）
- Agilent 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号 5182-0716）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号 5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱（部件号 699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机、低延迟体积配置的 1312B 二元泵、G1367E 自动进样器、G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

水解与样品预处理

1. 往 0.5 mL 尿液中加入内标，使其浓度为 1000 ng/mL；推荐使用 12 × 75mm 玻璃试管
2. 加入 125 µL 浓盐酸
3. 在加热装置中于 95 ±5 °C 水解 90 min
4. 冷却。然后加入 2 mL 0.1 M 醋酸钠缓冲液（pH 4.5）
5. 用 250 µL 7 M 的 KOH 溶液中和，涡旋，测定其 pH 值，应小于 6
6. 以 6000 rpm 的速度离心 20min

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后使其自然滴出
2. 上样或加载上清液
3. 淋洗 1：1 mL 2%甲酸溶液
4. 淋洗 2：1 mL 甲醇
5. 在真空（10-15 英寸汞柱）条件下，抽干 5-10 分钟
6. 用 2 mL 新鲜配制的甲醇：氢氧化铵（100: 20）溶液洗脱。先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后用低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
7. 在 40 °C 下蒸干
8. 用 0.5 mL 初始流动相（5%甲醇，95%水，0.1%甲酸）复溶

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1%甲酸水溶液	
流动相 B	0.1%甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	5
	0.5	5
	1.5	25
	2.5	55
	2.6	90
	5.6	90
	5.7	5
停止时间	5.8 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	2 µL	
进样并洗针		
洗针	用甲醇: 水（75: 25）冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数

离子检测模式	正离子
毛细管电压	3,000 V
干燥气流速	10 L/min
干燥气温度	350 °C
雾化气压力	35 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	400 °C
喷嘴电压	0 V

MS 参数

扫描类型	动态 MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.0min-切换阀到 MS
Delta EMV (+)	0 V

结果与讨论

在酸性 pH 条件下，吗啡、可待因及其衍生物的叔胺基团质子化，从而分析物可以通过疏水作用和强阳离子交换作用被高效的保留在 Plexa PCX 聚合物吸附剂上。

用 100%甲醇淋洗 SPE 小柱可消除大部分的基质干扰而不会造成阿片类药物损失。在有机洗脱液中添加强碱，以破坏分析物与强阳离子交换吸附剂之间的离子相互作用。在进行样品洗脱之前，将适量 20%氢氧化铵溶液添加到甲醇中，以提高阿片类药物的回收率。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50mm，2.7 µm 色谱柱能实现阿片类药物及其潜在干扰化合物的良好分离，并获得了极佳的峰形，同时分析可在 2.5min 内完成（如图 2 所示）。液相色谱分离首先采用低有机溶剂比例（5%）的流动相，使尿液中的盐类和其它极性成分在样品运行开始时先被洗脱。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液（0 到 1 min），以尽量减少离子源污染。1.0 min 时切换阀将液流转至质谱检测器后即刻开始数据采集。0.8 mL/min 的流速可获得较短的分析时间和再平衡时间。

在图 2 所示色谱图中，只有可待因和去甲可待因这一对色谱峰（峰 4 和 5）部分分离，但由于这些化合物具有不同的母离子和转换离子， 因此可待因定量时去甲可待因信号所产生的任何可能的干扰都可以排除。

在另一项实验中，测试了 Plexa PCX 吸附剂是否存在使去甲可待因甲基化并转换为可待因的可能性。试验结果均为阴性；在添加了去甲可待因标准品的阴性尿样中并未检测到可待因，因此本文可采用上述提取方法。

在进行干扰物测试时，推荐使用利用一个特定转换离子，通过保留时间和 ΔRT（时间窗）调整的动态 MRM 方法。当然，一旦确定干扰组分已经分离出去，吗啡、可待因及其内标物的数据采集即可通过常规的 MRM 进行。

SAMHSA 准则要求分析目标化合物和内标物时必须使用一个定量离子和至少一个定性离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1）信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
可待因	300.2	215.1	130	23
可待因	300.2	165.1	130	46
可待因	300.2	153.1	130	50
可待因-D_6	306.2	165.1	130	44
可待因-D_6	306.2	218.1	130	23
吗啡	286.1	201.1	130	23
吗啡	286.1	181.1	130	40
吗啡	286.1	165.1	130	43
吗啡 -D_6	292.1	181.1	130	40
吗啡 -D_6	292.1	165.1	130	42
吗啡-3-葡萄糖苷酸	462.2	286.1	162	45
羟考酮	316.2	298.1	130	15
羟吗啡酮	302.2	284.1	130	17
氢可酮	300.2	199.1	130	30
去甲可待因	286.1	225.1	130	20
氢吗啡酮	286.1	185.1	130	28

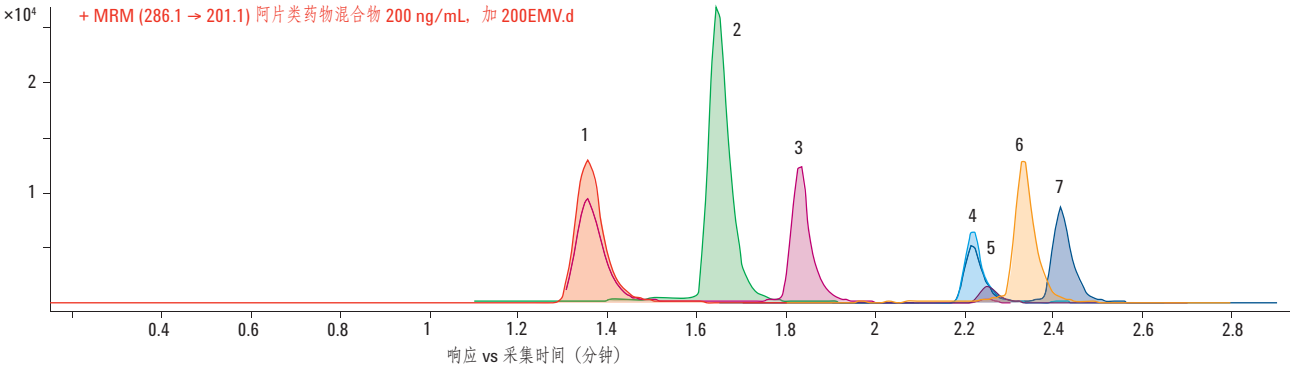


图 2. 阿片类药物与其潜在干扰物在 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50mm，2.7 µm 色谱柱上分离的叠加 MRM 提取离子色谱图。各分析物在尿液中的浓度均为 200 ng/mL。色谱峰按洗脱顺序分别为：1、吗啡；2、羟吗啡酮；3、氢吗啡酮；4、可待因；5、去甲可待因（紫红色小峰）；6、羟考酮；7、氢可酮

按照上述步骤处理样品时，尿液中加标浓度为 10,000 ng/mL 的吗啡-ß-3-葡萄糖苷酸标准品有 97-99.2%转换为吗啡。吗啡-ß-3-葡萄糖苷酸分析所用的 MS 参数列于表 1 中，供有兴趣检测水解效率的分析人员参考。

吗啡和可待因的定量峰在浓度为 200 ng/mL 时获得的信噪比超过 150: 1（如图 3，上面的 1 和 2 图所示）。这说明 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能，能够非常可靠地检测远低于 SAMHSA 限量浓度的阿片类药物。

图 4 给出了 5 个浓度水平的尿液提取物中标准品的校准曲线。通过分别向阴性尿液中加入吗啡和可待因标准品，制备两者浓度分别为 200、1000、2000、10000 和 2000 0 ng/mL 的一系列校准标准溶液。添加氘代内标吗啡-D6 和可待因-D6 的浓度均为 1000ng/mL。各曲线良好的线性关系（$R^2 \geq 0.998$）表明该方法在很宽的动态浓度范围内呈线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

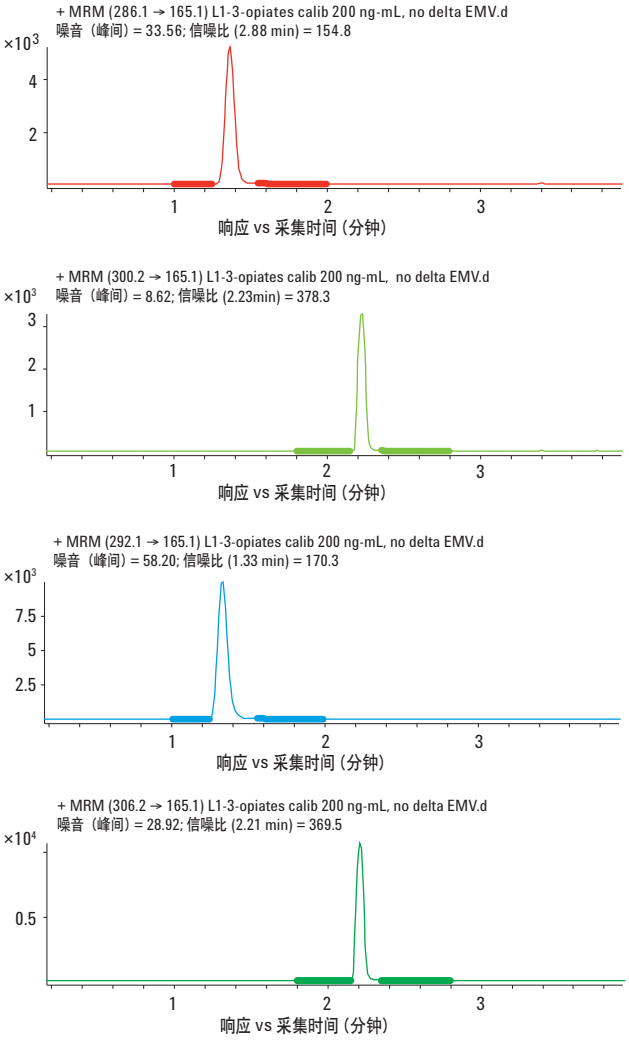


图 3. 尿液提取物中吗啡与可待因（200 ng/mL）和吗啡-D6 与可待因-D6（1000 ng/mL）的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱。噪声区域以加粗的形式显示

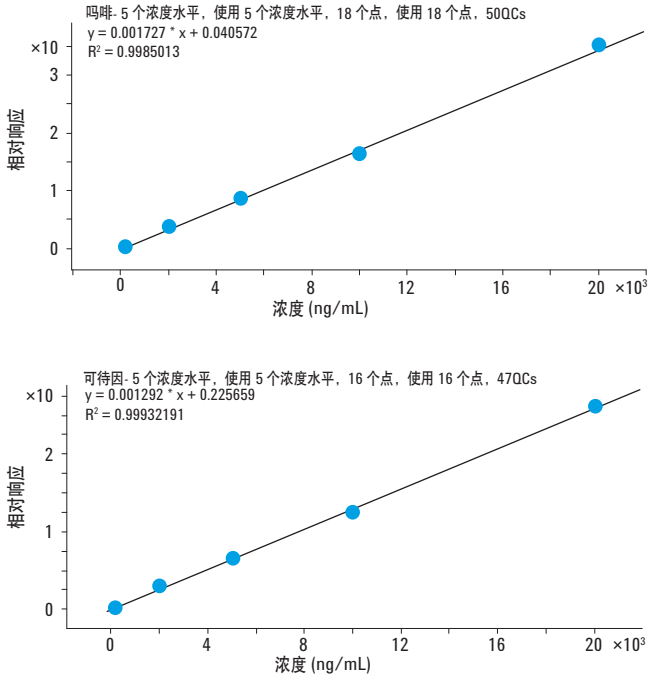


图 4. 从尿液中提取的吗啡（上图）和可待因（下图）的校准曲线示例。浓度范围为 200 至 20 000 ng/mL。线性相关系数 $R^2 \geq 0.998$

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的吗啡和可待因预加到阴性尿液中，然后进行 SPE 萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用相同的方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入吗啡和可待因标准品到 2000 ng/mL（固相萃取后加标），平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（即复溶溶剂），使其浓度为 2000 ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

表 2. 在限量浓度条件下阿片类药物的分析方法评价，n= 5

参数	吗啡	可待因
处理效率（%）	83	85
萃取回收率（%）	85	86
基质效应（%）	98	99
准确度（%）	108	108
精密度（CV）（%）	0.6	0.7

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的提取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得的。

表 2 显示了吗啡和可待因的高提取回收率和高处理效率（约 85%）。高基质效应（98-99%）表明只有 1-2%的信号由于离子抑制作用而损失，从而证明了经 Plexa 吸附剂处理的提取物具有优异的纯净度。同时该方法具有高准确度（目标物浓度的±10%之内）和极好的精密度（CV <1%）。

结论

本文所描述的固相萃取样品制备与 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全遵循 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高重现性的有法律效力的数据结果。其硬件配置与 2011 版 SAMHSA 方法中的相同均来自安捷伦。这些方法特别为安捷伦 1100 和安捷伦 1200 LC 系列的所有用户开发，这些 LC 系统的背压不超过 400 bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，离子源参数可以很容易地进行修改。安捷伦科技可提供电子版的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

参考文献

1. Anon (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/
2. R. Baselt (2008) Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. J. Hughes and P. Moorman (2011) Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing. Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem/cn.
4. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Analytical Chemistry, 75: 3019-3030.
5. P. Moorman and J. Hughes (2010) Opiates (morphine and codeine) in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS). SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5875EN.
6. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.

7. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller (2009) A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples for morphine, codeine, 6-acetylmorphine, and benzoylecgonine. Journal of Analytical Toxicology, 33: 398-408.

8. P. Wang, J. A. Stone, K. H. Chen, S. F. Gross, C. A. Haller, and A. H. Wu (2006) Incomplete recovery of prescription opioids in urine using enzymatic hydrolysis of glucuronide metabolites. Journal of Analytical Toxicology, 30: 570-575.

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 13 日，中国印刷
5990-9625CHCN

Agilent Technologies

应用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 和 Agilent Poroshell 120 对尿液中的苯环利啶进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用和精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室采用 LC/MS/MS 法确认初步药物测试结果。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生操作，因此它远比以前使用的 GC/MS 法要简便得多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的苯环利啶的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六种简便检测方法之一，该方法主要使用安捷伦产品进行分析，包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂，Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.7 µm 表面多孔 LC 色谱柱，Agilent 1200 Infinity LC 系统以及应用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

苯环利啶（PCP）是一种合成药物，为解离型麻醉药的一种。其致幻性和神经毒性作用为人所熟知，并且在高剂量时，它可对人体造成永久性损害。5-20%的 PCP 以原型药物形式从尿液中排出（Baselt，2008）。因此，它以药物原型的形式即可被检测到，无需水解和测量其代谢物。摄入药物后的数天内均可在尿液中检测到 PCP。在生物样品中它的稳定性良好。含有 PCP 的冷冻尿样可以贮存达一年，而且仅需 4 ºC 冷藏即可满足短期贮存要求。

苯环利啶有一个 3 环结构，包括一个苯环、一个环己烷环和一个哌啶环（如图 1 所示）。它是一种弱有机碱，几乎呈非极性，并有较高的 logP 值，为 4.69（Drug Bank）。SAMHSA 最新规定苯环利啶的最高限量浓度为 25 ng/mL，其 10% 为检测限，即 2.5 ng/mL。

由于 Agilent Bond Elut Plexa 吸附剂的独特性质，本文所描述的简单提取方法可获得 PCP 的高回收率提取，且重复性好。不像其它聚合物吸附剂，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重复性的实现，主要得益于色谱柱填料的窄粒径分布，并且不含易引起堵塞的细颗粒。

我们选择了具有高容量和极佳分离性能的 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱。与亚 2 µm UHPLC 色谱柱相比，填充了表面多孔 2.7 µm 颗粒的 Poroshell 120 色谱柱与其具有相似的柱效，但背压却减少了 40%左右，因此，它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规 LC 系统上采用更高的流速来提高分辨率，并同时缩短分析时间和再平衡时间。

本方法在较小的样品进样体积（2 µL）和无预富集的条件下，获得了极佳的信噪比（样品浓度 2.5 ng/mL 时>200:1，该浓度只有 SAMHSA 规定限量浓度的 10%），这得益于应用了 AJST 技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发，2010）采用了 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品及操作步骤。

实验部分

分析物

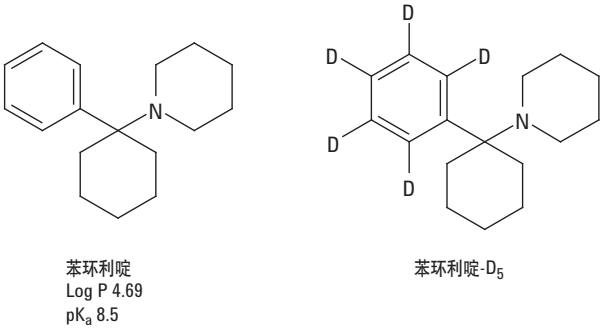


图 1. 苯环利啶分析物及其化学结构

药物标准品购自 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（苯环利啶）和 100 µg/mL（苯环利啶-D_5）的甲醇溶液。

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg, 3 mL（部件号 12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号 12234100）
- Agilent 截止阀（部件号 12234520）
- Agilent 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号 5182-0716）或硅烷化样品小瓶（部件号 5183-2072）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号 5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱（部件号 699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机、配置低延迟体积的 1312B 二元泵、G1367E 自动进样器、G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

预处理

往 1 mL 尿液中加入内标，使其浓度为 50 ng/mL；推荐使用 12 × 75 mm 玻璃试管。加入 1 mL 2%甲酸溶液，涡旋；如果溶液浑浊则离心。

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后使其自然滴出
2. 上样/加载上清液
3. 淋洗 1：1 mL 2%甲酸溶液
4. 淋洗 2：1 mL 甲醇
5. 在真空（10-15 英寸汞柱）条件下，抽干 5-10 分钟
6. 用 1 mL 新鲜配制的乙酸乙酯：甲醇：氢氧化铵（80: 20: 5）溶液进行洗脱。先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后用低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
7. 氮气吹干
8. 用 1 mL 初始流动相（10%甲醇、90%水、0.1%甲酸）复溶

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1%甲酸水溶液	
流动相 B	0.1%甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	10
	0.5	10
	2.5	70
	2.51	90
	5.5	90
	5.51	10
停止时间	5.6 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	2 µL	
进样并洗针		
洗针	用 75: 25 的甲醇：水冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数

离子检测模式	正离子
毛细管电压	3,000 V
干燥气流速	10 L/min
干燥气温度	350 °C
雾化气压力	35 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	400 °C
喷嘴电压	0 V

MS 参数

扫描类型	MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.2 min –切换阀到 MS
Delta EMV (+)	200 V

结果与讨论

在酸性条件下，苯环利啶的叔胺基团质子化，从而分析物可以通过疏水作用与强阳离子交换作用被高效的保留在 Agilent Bond Elut Plexa PCX 聚合物吸附剂上。

用 100%甲醇洗脱 SPE 小柱可以去除大部分的基质干扰而无 PCP 的流失。向有机洗脱液中添加强碱，以破坏分析物与强阳离子交换吸附剂之间的离子相互作用。在样品洗脱之前，将 5% 氢氧化铵溶液添加到乙酸乙酯-甲醇（80:20）中，以提高 PCP 的回收率

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱可实现尿液萃取物中苯环利啶的快速分离，并可获得良好的峰形（如图 2 所示）。液相色谱分离首先采用低有机溶剂比例（10%）的流动相，从而使尿液中的盐类和其它极性成分在样品运行开始时先被洗脱。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液，以尽量减少离子源污染。在第 1.2 分钟时切换阀将液流转至质谱检测器并即刻开始数据采集。0.8 mL/min 的流速可获得较短的分析时间和再平衡时间。

浓度为 2.5 ng/mL 样品色谱峰(如图 2,上图所示)的信噪比>200:1，该结果表明 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能，可用于检测远低于 SAMHSA 规定限量浓度的 PCP（10%）。苯环利啶的疏水性极强，容易吸附在任意活性表面位点上。为避免交叉污染，我们推荐使用高效自动进样器的外部进样针端口冲洗功能，当样品浓度较高时可在进样后运行空白流动相。如果需要，洗针时间可以从 10 秒增加至 20 秒。

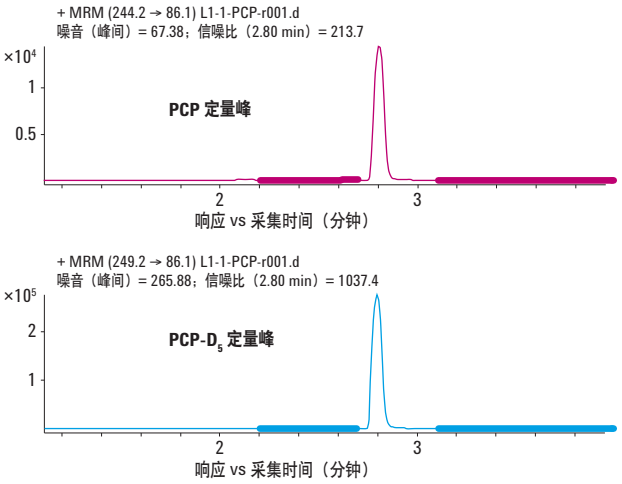


图 2. 尿液萃取物中 PCP（2.5 ng/mL）和 PCP-D5（50 ng/mL）的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱。噪音区域以加粗的形式显示

SAMHSA 准则要求分析目标化合物和内标物时必须使用一个定量离子和至少一个定性离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1)信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

图 3 为 5 个浓度水平苯环利啶的尿液萃取标准品的校准曲线。通过向阴性尿液中加入 PCP 标准品,制备浓度分别为 2.5、25、100、250 和 1000 ng/mL 的一系列校准标准溶液。添加氘代内标 PCP-D5 的浓度为 50 ng/mL。R2 > 0.999，线性关系良好，表明该方法在很宽的动态浓度范围内呈线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

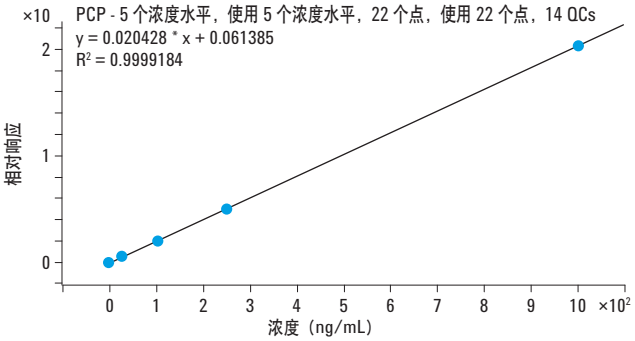


图 3. 尿液萃取物中苯环利啶的校准曲线示例。校准范围为 2.5-1000 ng/mL。线性关系良好，R^2>0.999

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
PCP	244.2	86.1	80	7
PCP	244.2	159.1	80	7
PCP	244.2	91.1	80	34
PCP-D_5	249.2	164.1	80	7
PCP-D_5	249.2	86.1	80	7

本方法采用 MRM 扫描模式，设置为常态而非动态检测，因为动态 MRM 模式对单一化合物的检测没有优势。

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的 PCP 预加到阴性尿液中，然后进行萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用同样方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入 PCP 标准品到 25 ng/mL，平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（复溶溶剂），使其浓度为 25 ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的萃取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得的。

表 2 显示了苯环利啶较高的萃取回收率（85%）、良好的准确度（93%）和精密度（0.5 %）。98%的基质效应表明只有 2%的信号由于基质干扰导致的离子抑制作用而损失（2%），从而证明了经 Plexa 吸附剂处理的萃取物拥有优异的纯净度。

表 2. 苯环利啶的分析方法评价，n=5

	%
处理效率	83
萃取回收率	85
基质效应	98
准确度	93
精密度（CV）	0.5

结论

本文所描述的固相萃取样品制备与 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全遵循 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高准确度、精密度和重现性的有法律效力的数据结果。其硬件配置与 2011 版 SAMHSA 方法中的相同均来自安捷伦。这些方法特别为 Agilent 1100 和 Agilent 1200 LC 系列的所有用户开发，这些 LC 系统的背压耐受不超过 400 bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，我们可以很容易地修改离子源参数。安捷伦科技可提供电子版的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

参考文献

1. Anon (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/

2. R. Baselt (2008) Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.

3. J. Hughes and P. Moorman (2011) Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing. Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem/cn.

4. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Analytical Chemistry, 75: 3019-3030.

5. P. Moorman and J. Hughes (2010) Phencyclidine in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS). SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5864EN.

6. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.

7. Sergi, M., Compagnone, D., Curini, R., D'Ascenzo, G., Del Carlo, M., Napoletano, S. and Risoluti, R. (2010) Micro-solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of stimulants, hallucinogens, ketamine and phencyclidine in oral fluids. Analytica Chimica Acta, 675: 132-137.

8. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller (2010) A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples II: amphetamine, methamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyethylamphetamine, phencyclidine, and (±) -11-nor-9-carboxy-Δ^9 – tetrahydrocannabinol. *Journal of Analytical Toxicology*, 34: 430-443.

更多详细信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 10 日，中国印刷
5990-9626CHCN

Agilent Technologies

应用 Agilent Bond Elut Plexa 和 Agilent Poroshell 120 对尿液中的 11-nor-9-羧基-Δ^9-四氢大麻酚进行 SAMHSA 标准的 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医与药物测试

作者

Irina Dioumaeva, John M. Hughes

Agilent Technologies, Inc.

摘要

由美国药物滥用和精神健康服务管理局（SAMHSA）颁布，于 2010 年 10 月开始生效的新准则，允许在政府认证的药物检测实验室采用 LC/MS/MS 法确认初步药物测试结果。由于 LC/MS/MS 法不需要衍生步骤，因此它远比以前应用的 GC/MS 法要简便的多。我们提出了一种满足最新 SAMHSA 准则要求的 11-nor-9-羟基-Δ^9-四氢大麻酚的分析方法，并对其线性、检测限（LOD）、准确度和精密度进行论证，还对该方法的基质效应、萃取回收率和总处理效率进行了考察。这是涵盖所有 SAMHSA 监控药物类别的一系列六个简便检测方法之一，该方法主要应用安捷伦产品进行分析，例如 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂、Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.7µm 表面多孔 LC 色谱柱、Agilent 1200 Infinity LC 系统和应用安捷伦喷射流技术（AJST）增强电喷雾离子源的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统。

Agilent Technologies

前言

11-nor-9-羧基-Δ^9-四氢大麻酚（THCA、“THC-酸”、THC-COOH）是四氢大麻酚（Δ^9-THC）的一个代谢产物，而四氢大麻酚是大麻中活性最高的成分。THCA 以其葡萄糖苷酸缀合物的形式，通过尿液排出，并且其排泄时间可达几周。SAMHSA 新规定的 THCA 最高限量浓度是 15 ng/mL，检测限为 10% 的限量浓度，即 1.5 ng/mL。

分析 11-nor-9-羧基-Δ^9-THC 时的样品制备需要碱水解尿样，以将葡萄糖苷酸缀合物转化为 THCA 来测定该代谢物的总量。尽管 THCA 是一种羧酸，但是为了建立一个可适用于所有 SAMHSA 监测药物预处理的单一的分析方法，我们在安捷伦吸附剂中选择了 Agilent Bond Elut Plexa PCX，一种混合型阳离子交换吸附剂来用于样品萃取。它可通过疏水作用有效地保留 THCA。

由于 Plexa 吸附剂的独特性质，本萃取方法可以获得 THCA 的高回收率萃取，且重复性好。不像其它的聚合物吸附剂，Plexa 颗粒具有无氨基的羟基化表面，避免了蛋白质的结合。从而获得了最小的离子抑制作用和最高的检测灵敏度。高流速和良好重复性的实现，主要得益于色谱柱填料的窄粒径分布，并且不含易引起堵塞的细颗粒。

选择 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50 mm，2.7 µm 色谱柱是由于它具有高容量和极佳的分离性能。Poroshell 120 色谱柱填充了表面多孔 2.7 µm 颗粒，能提供与亚 2 µm UHPLC 色谱柱相似的柱效，但背压会减少大约 40%。因此，它甚至允许用户在耐压 400 bar 的常规 LC 系统上采用更高的流速来提高分辨率，同时缩短分析时间和再平衡时间。

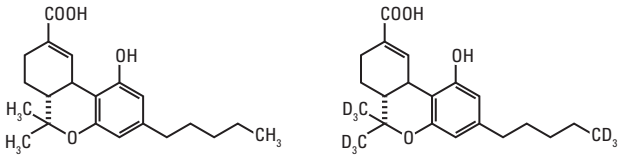
由于基本上是非极性（log P>6）的化合物，大麻素类化合物并不适合使用电喷雾电离，而通常应用 APCI 电离进行分析。然而，由于羧基的存在，在负离子模式下，THCA 比 Δ^9-THC 和 11-羟基-Δ^9-THC 更易电离。选择电喷雾离子源用于 THCA 检测也保证了使用单一质谱配置即可方便的用于所有 SAMHSA 监管药物的检测。

本方法在较小的样品进样体积（10 µL）和无预富集的条件下，限量浓度和 10% 限量浓度的样品均获得了极好的信噪比（分别大约为 100:1 和 10:1），这得益于应用了安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统电喷雾离子源增强了检测灵敏度。

安捷伦以前的分析方法（由 Moorman 和 Hughes 开发，2010）采用了 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统和其它的 SPE/LC 产品及操作步骤。

实验部分

分析物



11-nor-9-羧基-Δ^9-THC
Log P（预测值）6.06-6.36, pKa 4.5

11-nor-9-羧基-Δ^9-THC-D_9

图 1. 11-nor-羧基-Δ^9-四氢大麻酚分析物及其结构

药物标准品购于 Cerilliant 公司，为 1 mg/mL（11-nor-9-羧基-Δ^9-THC）和 100 µg/mL（11-nor-9-羧基-Δ^9-THC-D9 和 11-nor-9-羧基-Δ^9-THC-葡萄糖苷酸）的甲醇溶液。

材料与仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱 30 mg，3 mL（部件号 12108303）
- Agilent VacElut 20 多管真空装置（部件号 12234100）
- Agilent 截止阀（部件号 12234520）
- Agilent 硅烷化的 2 mL 自动进样器样品瓶（部件号 5183-2072）
- Agilent AS 样品瓶螺纹口瓶盖（部件号 5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50mm，2.7 µm 色谱柱（部件号 699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微型脱气机、低延迟体积配置的 1312B 二元泵、G1367E 自动进样器、G1330B 柱温箱）

MS

- 配有应用 AJST 技术电喷雾离子源的 Agilent 6460A Triple Quadrupole LC/MS 系统

样品制备

水解和样品预处理

1. 往 0.5 mL 尿液中加入内标，使其浓度为 50 ng/mL；推荐使用甲醇冲洗并干燥过的 12×75 mm 玻璃试管
2. 加入 100 µL 7 M KOH 溶液，涡旋
3. 在加热装置中于 60 ± 5 ºC 水解 30 分钟
4. 冷却。加入 125 µL 甲醇，涡旋
5. 加入 1.5 mL0.2 M 醋酸钠缓冲液（pH 4）
6. 用 100 µL 冰醋酸中和样品溶液，涡旋
7. 如果溶液浑浊则离心

萃取

1. 用 0.5 mL 甲醇活化 Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱，浸润，然后使其自然滴出
2. 上样/加载上清液
3. 淋洗 1：2mL 10: 90 的乙腈: 2% 乙酸溶液淋洗 2 次
4. 淋洗 2：2mL 30: 70 的乙腈: 2% 乙酸溶液
5. 在真空（10-15 英寸汞柱）条件下，抽干 5-10 分钟
6. 用 200 µL 正己烷淋洗，在低真空（2-3 英寸汞柱）条件下抽干
7. 在高真空下干燥 3-4 分钟
8. 用 0.5mL 80: 20 的乙酸乙酯：异丙醇混合液洗脱。浸润，先使洗脱液自然滴落至收集小瓶中，然后于低真空（2-3 英寸汞柱）抽滤
9. 再向吸附柱中加入 1 mL 相同的洗脱剂，重复浸润–洗脱过程
10. 在 40 ºC 下蒸干
11. 使用 0.5 mL 初始流动相（30%甲醇、70% 5 mM 甲酸铵溶液）复溶

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	5 mM 甲酸铵水溶液	
流动相 B	甲醇	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（分钟）	% B
	0.0	30
	1	95
	5	95
	5.1	30
停止时间	5.2 min	
后运行时间	2 min	
最高泵压	400 bar	
进样体积	10 µL	
进样并洗针	用 75: 25 的甲醇: 水溶液冲洗进样口 10 秒	
禁止重叠进样		
禁止自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数

离子检测模式	负离子
毛细管电压	4000 V
干燥气流速	11 L/min
干燥气温度	320 ºC
雾化气压力	18 psi
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	320 ºC
喷嘴电压	0 V

MS 参数

扫描类型	MRM
预运行脚本	SCP_MSDiverterValveToWaste(){MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1：1.4min 切换阀到 MS
Delta EMV (-)	800 V

结果与讨论

大麻素类化合物易吸附在玻璃和塑料容器上是众所周知的。为使样品损失最小并且保证方法的重现性，我们强烈推荐只使用新鲜配制的样品贮备溶液和校准溶液，并且采用硅烷化或者完全用甲醇冲洗并干燥过的玻璃器皿，最终提取物复溶后应立即进行分析。

THCA 通过疏水作用保留在混合型阳离子交换吸附剂 Plexa PCX 上。100%甲醇这种常用于淋洗离子交换 SPE 柱的溶剂，并不适用于淋洗 THCA 萃取物，因为高浓度的有机溶剂会洗脱掉吸附剂

上的分析物。为使基质干扰最小化，在淋洗步骤 1 和 2 中分别使用了 10%和 30%的乙腈，用正己烷冲洗的目的也是如此。当单独使用并且量很小时（200 µL），正己烷可以洗脱掉大多数脂类，同时不会导致分析物的解吸附，因为 THCA 的疏水性很强（logP>6），它可以强烈地保留在 Plexa 颗粒的疏水中心。在洗脱步骤中推荐延长浸润过程来强化溶剂和分析物之间的相互作用，从而提高分析物的回收率。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C 18 3×50 mm，2.7 µm 色谱柱可以快速分离尿样提取物中的 THCA，并且可获得极佳的峰形（如图 2 所示）。LC 分离首先采用较低有机溶剂比例（30%）的流动相，从而使尿液中的盐类和其它极性成分在样品运行开始时先被洗脱。由于流动相梯度陡度较大，剩余的疏水干扰物质大部分先于分析物被洗脱出来，因此在目标峰洗脱出来的时候（1.96 min）就减小了基质效应。0.8 mL/min 的流速可以获得较短的分析时间和再平衡时间。每次样品运行开始时先将液流转换使其流至废液（0 到 1.4 min），以尽量减小离子源污染。在第 1.4 分钟时切换阀将液流转至质谱检测器并立刻开始数据采集。

SAMHSA 准则要求分析目标化合物和内标物时必须使用一个定量离子和至少一个定性离子。目标分析物的第三个转换离子（见表 1）信息可提供更高的定性能力。Agilent MassHunter Quantitative 软件可自动计算定性离子比率，并可以标出那些超出可接受范围的离子。

表 1. MRM 模式数据采集参数

化合物	母离子	子离子	裂解电压	碰撞能量
11-nor-9-羧基-Δ^9-THC	343.2	299.2	135	18
	343.2	245.1	135	30
	343.2	191.1	135	33
11-nor-9-羧基-Δ^9-THC-D_9	352.2	308.2	145	18
	352.2	254.2	145	30
11-nor-9-羧基-Δ^9-THC 葡萄糖苷酸	519.2	343.2	160	22
	519.2	299.2	160	36

根据上述步骤对尿样处理，在阴性尿液中加入 11-nor-9-羧基-Δ^9-THC 葡萄糖苷酸至浓度为 1000 ng/mL，该样品在处理后以负离子模式检测。我们发现只出现了一个非常大的 THCA 峰，远远超过了校准最高浓度 600 ng/mL 样品的色谱峰。这表明葡萄糖苷酸通过碱水解已经完全转化为 THCA。检测 11-nor-9-羧基-Δ^9-THC 葡萄糖苷酸所用的 MS 参数列于表 1 中，供有兴趣检测水解效率的分析人员参考。

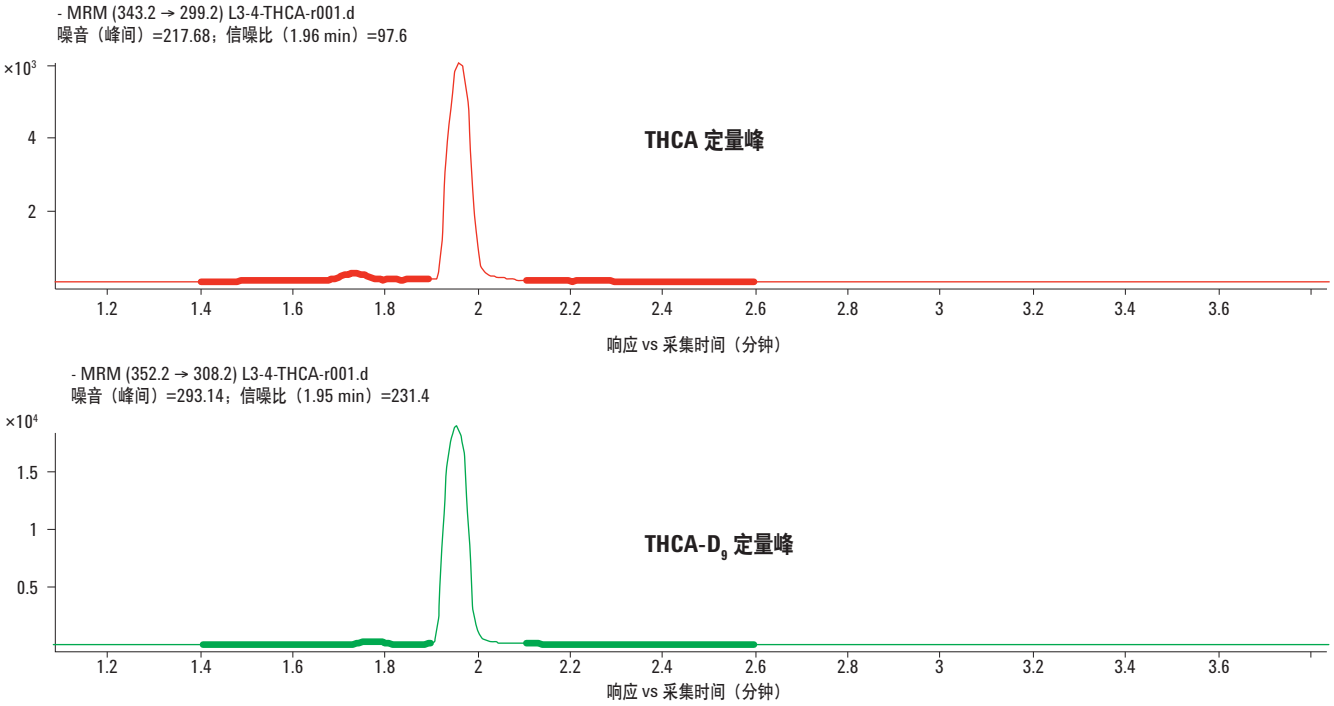


图 2. 尿液萃取物中 THCA（15 ng/mL）和 THCA-D9（50 ng/mL）的 MRM 提取离子色谱图。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3×50 mm，2.7 µm 色谱柱。噪音区域以加粗的形式显示

本方法采用 MRM 扫描模式，设置为常态而非动态检测，因为动态 MRM 模式对单一化合物的检测没有优势。

由于具有强烈的疏水性，THCA 不仅可以附着在玻璃器皿上，而且还能附着在进样器部件和液相流路管线上。为了避免交叉污染，我们建议在运行了高浓度样品后运行一个空白流动相，并且使用自动进样器 Injector Flush Pump 选项。如果需要，冲洗针的时间可以从 10 秒提高到 20 秒。

在限量浓度为 15 ng/mL 条件下 THCA 的信噪比大约为 100:1（如图 2，上图所示），表明了 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS 系统具有优异的性能，并且对于远小于 SAMHSA 规定限量浓度的样品（10%），也能可靠地进行检测

图 3 展示了五个浓度水平萃取尿液标准品的校准曲线。通过向阴性尿液中加入 THCA 标准品，配制浓度分别为 1.5、15、75、300 和 600 ng/mL 的一系列校准标准溶液。添加氘代内标 THCA-D9 的浓度是 50 ng/mL。$R^2 > 0.999$，线性关系良好，表明该方法在很宽的动态浓度范围内呈线性，符合 SAMHSA 准则的要求。

方法评价

表 2 中方法的各项性能指标系根据 Matuszewski 等（2003）提出的原则计算得到的，其作为行业标准用于评价 LC/MS/MS 分析方法已被广泛接受。LC/MS/MS 测试的样品及其萃取步骤如下：第一组，将限量浓度水平的 THCA 预加到阴性尿液中，然后进行萃取，平行五份，进样分析。第二组，将阴性尿液利用同样方法进行萃取，然后萃取物用初始流动相溶液复溶，之后加入 THCA 标准品到 15 ng/mL，平行五份，进样分析。第三组是直接加标至初始流动相（复溶溶剂），使其浓度为 15 ng/mL 的限量浓度（流动相加标）。

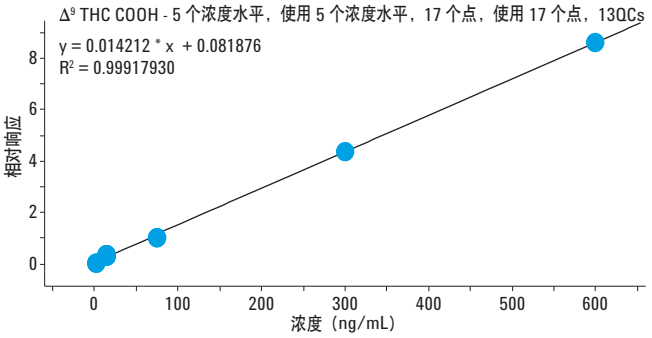


图 3. 尿液提取物中 THCA 的校准曲线示例。校准范围为 1.5 到 600 ng/mL。线性相关系数 R^2>0.999

处理效率（即绝对回收率）是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与其无基质的流动相加标后进样分析获得的相应峰面积的比值。萃取回收率是 SPE 萃取加标的阴性尿液后进样分析，获得的目标分析物的峰面积与经过相同方法萃取阴性尿液后的提取物加标样品进样分析获得的相应峰面积的比值。基质效应是分析 SPE 萃取阴性尿液后的提取物加标样品，获得的目标分析物的峰面积与其流动相加标后分析获得的相应峰面积的比值。

准确度是通过校准曲线计算的分析物检测浓度与添加了已知量目标分析物样品的预期浓度的比值。精密度或变异系数（CV）用来衡量重复性，系采用五个测量值的平均值计算其百分标准偏差获得的。

本法的特点是拥有较高回收率以及结果数据很高的准确度（98%）和精密度（2.2%）（如表 2 所示）。超过 100%的基质效应表明出现了离子增强作用，而非离子抑制作用。仅 13%的信号增强证明了 Plexa PCX 萃取物具有比较好的纯净度。鉴于大麻素类化合物分析的挑战性较大，73%的总处理效率可以说是非常高的。

表 2. 11-nor-羧基-Δ^9-四氢大麻酚在限量浓度水平时的分析方法评价，n=5

	%
处理效率	73
萃取回收率	65
基质效应	113
准确度	98.2
精密度（CV）	2.2

结论

本文所描述的固相萃取样品制备与 LC/MS/MS 检测相结合的分析方法完全遵循 SAMHSA 要求，为认证实验室的药物测试或其它有类似要求的分析环境的测试提供高重现性的有法律效力的数据结果。THCA 分析方法的硬件配置与其它安捷伦 SAMHSA 方法相同。这些方法可以在所有型号的 Agilent 1100 和 Agilent 1200 LC 系列仪器上运行，并且这些 LC 系统的背压不超过 400 bar。采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统应用本方法时，我们可以很容易地修改离子源参数。安捷伦科技可提供电子版的 LC/MS/MS 数据采集和定量分析方法。

参考文献

1. Anon (2011) Drugs Testing Book 2011. http://drugstestingbook.com/
2. R. Baselt (2008) Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.
3. J. Hughes and P. Moorman (2011) Confirmation by Triple Quadrupole LC/MS/MS for HHs-compliant Workplace Urine Drug Testing. Agilent Technologies, Inc. Seminar available from www.agilent.com/chem/cn.
4. P. Moorman and J. Hughes (2010) 11-nor-9-carboxy-Δ^9–tetrahydrocannabinol in Urine by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC/MS/MS). SOP, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-5874EN.
5. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Analytical Chemistry, 75: 3019-3030.
6. SAMHSA (2010) Manual for Urine Laboratories, National Laboratory Certification Program, 1 October 2010. U. S. Department of Health and Human Services.
7. P. Stout, N. Bynum, C. Lewallen, J. Mitchell, M. Baylor, and J. Ropero-Miller (2010) A comparison of the validity of gas chromatography - mass spectrometry and liquid chromatography - tandem mass spectrometry analysis of urine samples II: amphetamine, methamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyethylamphetamine, phencyclidine, and (±) -11-nor-9-carboxy-Δ^9 – tetrahydrocannabinol. Journal of Analytical Toxicology, 34: 430-443.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料引起的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012 年 1 月 13 日，中国印刷
5990-9627CHCN

Agilent Technologies

唾液中的合成大麻素类成分

应用简报

法证与毒理学

作者

Cynthia Coulter，Margaux Garnier 和
Christine Moore
毒理学研究与开发
Immunalysis 公司，
829 Towne Center Drive，
Pomona，California 91767
美国

前言

2011 年，“合成大麻素类”或“香料”化合物中，有五种在美国被禁用。它们是：

- 1-戊基-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-018)
- 1-丁基-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-073)
- 1-[2-(4-吗啉) 乙基]-3-(1-萘甲酰基)-吲哚 (JWH-200)
- 5-(1,1-二甲基庚基)-2-[(1R,3S)-3-羟基环己基]-苯酚 (CP-47,497)
- 5-(1,1-二甲基辛基)-2-[(1R,3S)-3-羟基环己基]-苯酚(大麻环己醇；CP-47,497 C8 同系物)

服用者描述这些药物具有类似大麻的作用，并且这些化合物中有一些与大麻受体有很强的结合作用。11-羟基-Δ^8-四氢大麻酚的（–）-1,1-二甲基庚基取代类似物（1,1-二甲基庚基-11-羟基四氢大麻酚），代号 HU-210，据报道它曾在 2009 年美国海关与边境保护局缉获的“香料黄金”、“香料白银”和“香料钻石”中被发现。HU-210 的效力被认为超过 Δ^9-四氢大麻酚（Δ^9-THC）100 倍，并且作为一种大麻类似物已被列入控制物质。JWH-250 也是我们经常遇到的品种，故我们也把它列入研究范围。

Agilent Technologies

作为一种在路边和工作场所进行药物检测的样本，唾液检测正日益流行。它容易采集，不具有侵害性，并且可获得近期用药的信息。本文工作中使用了 Quantisal 装置来收集唾液样本，并且描述了“香料”成分的检测过程。

样本收集装置、试剂和标准品

收集唾液样本的 Quantisal 装置包括了一个可以放在嘴里的棉质采集垫。当采集到 1 mL 唾液（±10%）时，吸收体积足量指示剂会变为蓝色，然后将采集垫放入缓冲液（3 mL）中，使可用于分析的样本总体积为 4 mL（3 mL 缓冲液 + 1 mL 唾液）。用于检测的药物浓度也会相应改变。

固相萃取小柱（Bond Elut Plexa）和液相色谱柱（ZORBAX RRHT）为安捷伦科技公司产品。JWH-018、JWH-073、JWH-200、JWH-250、HU-210、CP-47497 和 CP-47497 C8 同系物，以及氘代化合物 d9-JWH-018 和 d7-JWH-073 标准品购自 Cayman Chemicals 公司。

校准溶液与质控样品的制备

将氘代内标（*d9*-JWH-018 和 *d7*-JWH-073）和未标记的药物标准品制备为浓度 100 µg/mL 的甲醇溶液。用甲醇稀释适量贮备液到 10 µg/mL 的浓度，作为工作溶液。不用时，溶液于 –20 °C 贮存。向不含药物的合成唾液中加入不同浓度的化合物，制成质控样品。每批测试样本包括不含药物的阴性样品、4 ng/mL 和 40ng/mL 浓度的阳性质控样品。

样品制备

7 个用唾液制备的校准标准溶液中，各分析物的浓度依次为 0.5、2、5、10、20、50 和 100 ng/mL，加入氘代内标（10 ng/mL）。

使用 Agilent Bond Elut Plexa（30 mg/1 mL；部件号 12109301）固相萃取小柱。

1. 活化：甲醇（0.5 mL）；0.1 M 乙酸溶液（0.1 mL）
2. 取校准工作溶液、质控样品和样品各 1 mL，分别加入乙酸溶液（0.1 M；pH 4，1 mL）
3. 上样
4. 柱淋洗：去离子水 : 冰乙酸（80 : 20；1 mL）；去离子水 : 甲醇（40 : 60；1 mL）
5. 柱干燥（5 min）
6. 洗脱酸性/中性化合物：己烷:冰乙酸（98 : 2；2 mL）
7. 干燥小柱时蒸干提取物（7 min）
8. 洗脱碱性组分到相应的试管中：乙酸乙酯 : 氢氧化铵溶液（98 : 2；2 mL）
9. 40 °C 下氮吹蒸发至干。
10. 甲醇复溶样品残渣（50 µL）；转移至自动进样瓶中；旋紧瓶盖
11. 采用 LC-MS/MS 进行分析

液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）

安捷伦科技 1200 系列液相色谱泵与 Agilent 6430 三重四级杆 LC/MS 系统联用，采用电喷雾离子化模式（ESI），根据化合物的性质选择正离子或负离子检测。

色谱柱	Agilent ZORBAX RRHT Extend C18，（2.1 × 50 mm，1.8 µm，部件号 727700-902）
柱温	60 °C
进样体积	5 µL
流动相	溶剂 A：0.2% 乙酸溶液和溶剂 B：乙腈
	时间 0 min：95% A；5% B；5 min：100% B；7 min：5% B
	运行时间 9.2 min；后运行时间 3 min
	流速 0.5 mL/min
氮气温度	350 °C
干燥气流量	10 L/min
雾化器压力	55 psi
毛细管电压	+4000 V 正离子模式
	–4000 V 负离子模式

为每种药物选择并优化了两个离子对。表1列出了转换离子对、母离子（M+1；M-1）的优化碎裂电压和子离子碎片的碰撞能量。每一个序列分析要求其定量离子和定性离子的比率应在±20%以内，以满足阳性结果的判断标准。

表1. 多反应监测（MRM）transitions；优化的碎裂电压；在10 µg/mL浓度时定量分析“香料”化合物的允许离子转换范围

化合物	离子对	碎裂电压（V）	碰撞能量（eV）	极性	定量和定性离子对比率（范围）
d9-JWH-018	351.3 > 223.4	140	20	正离子	n/a
JWH-018	342.2 > 155.1	120	20	正离子	16–24
	342.2 > 214.2	120	20		
JWH-250	336.3 > 200.2	120	12	正离子	69–104
	336.3 > 188.2	120	20		
d7-JWH-073	335.3 > 207.2	120	20	正离子	n/a
JWH-073	328.2 > 155.1	120	20	正离子	60–90
	328.2 >127.1	120	35		
JWH-200	385.3 > 155.1	140	20	正离子	54–81
	385.3 > 114.2	140	25		
CP 47497 C8	331.3 > 313.3	160	25	阴离子	70–104
	331.3 > 259.3	160	35		
CP 47497	317.3 > 299.2	160	20	阴离子	75–113
	317.3 > 245.2	160	30		
HU-210	385.3 > 367.4	120	30	阴离子	13–20
	385.3 > 281.3	120	45		

标下划线的离子对用于定量；n/a= 不可用于内标

图 1 所示 10 ng/mL 浓度时化合物一级转换离子的色谱图；各化合物一级和二级离子对的比率也是在 10 ng/mL 浓度时测定的。

采集垫的回收率

制备各化合物添加浓度均为 4 和 40 ng/mL 的六个合成唾液样品。将采集垫置于上述样品液中收集 1 mL（±10%），这可以由植入采集器的蓝色体积足量指示剂来判断。然后将采集垫转移到 Quantisal 缓冲液中，加盖并放置过夜，模拟样品运输到实验室的过程。第二天取部分样品进行分析。采集垫的回收量与绝对浓度（100%）进行对比，绝对浓度系将药物加到缓冲液中，不加入采集垫室温放置过夜，然后提取和分析得到。

各化合物的采集垫提取百分回收率在 4 和 40 ng/mL（n = 6），两个浓度时均大于 60%。最高的是 4 ng/mL 时 HU-210 的回收率，达到 86%；最低的是 40 ng/mL 时 JWH-073 的回收率，只有 61%。两个浓度水平的回收率基本上一致（表 2）。

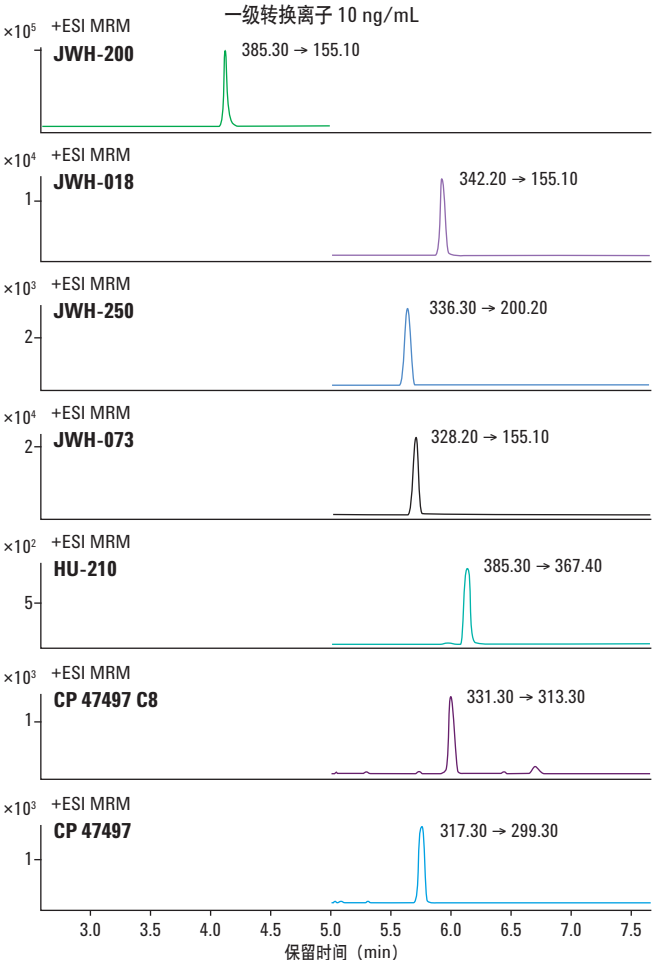


图 1. 10 ng/mL 浓度时的一级转换离子

表 2. 方法学验证数据

	JWH-018	JWH-073	JWH-200	JWH-250	CP 47497	CP 47497 C8	HU-210
LOQ（ng/mL）	0.5	0.5	0.5	2	0.5	2	5
日内误差							
4 ng/mL	3.9%	3.6%	5.0%	3.4%	4.9%	3.9%	8.6%
40 ng/mL	2.2%	2.1%	6.0%	2.0%	4.1%	4.3%	5.6%
日间误差							
4 ng/mL	8.8%	9.6%	6.2%	11%	7.7%	11%	10%
40 ng/mL	8.5%	7.9%	6.2%	11%	10%	11%	12%
采集垫回收率							
4 ng/mL	65.5%	67.4%	85.0%	66.5%	77.7%	76.0%	86.4%
40 ng/mL	70.6%	61.4%	81.4%	75.1%	71.3%	78.2%	75.7%
基质效应	-55%	-45%	-55%	-73%	-64%	-55%	-49%
处理效率	40%	51%	56%	24%	38%	45%	51%

数据分析

使用浓度范围 0.5–100 ng/mL 的线性回归分析绘制校准曲线。采用 Agilent MSD 软件计算每个浓度点中目标分析物与内标的峰面积比。数据拟合成一条线性最小二乘回归曲线，曲线未强制通过原点，且等权重。每种化合物监测了两种转换离子对用于确证分析；内标监测了一种离子对。定性离子对的比率要求在使用可接受的已知校准标准品所确定比率的 ±20% 之内。

线性和灵敏度

将溶液连续稀释到一个化合物可准确定量的最低浓度点获得方法的定量限（LOQ），即色谱峰形、保留时间（校准标准品的 2%）和定性离子对比率（± 20%）与 10 ng/mL 校准标准品测定结果比较是可以接受的。LOQ 的定量值必须在目标浓度的 ±20%以内。JWH-018、JWH-073、JWH-200 和 CP 47497 的定量限是 0.5 ng/mL；CP 47497 C8 和 JWH-250 的是 2 ng/mL；HU-210 的是 5 ng/mL（图 2）。所有化合物从 LOQ 到 100 ng/mL 浓度范围内线性关系良好（$R^2 > 0.99$；n = 5）。

基质效应

制备一个浓度为 10 ng/mL 的未经提取的药物标准品溶液，另外制备不含药物的基质提取物和阴性质控样品（提取物中只含有内标）。唾液中各化合物回收率的测定如下：首先测得浓度为 10 ng/mL 提取物（n=3）的响应 {R_{ES}}。然后提取唾液并向浓度为 10 ng/mL 的后提取物中加入药物（n=3）{R_{PES}}。通过方程式（R_{ES}/ R_{PES}）× 100 计算百分回收率。

基质效应（离子抑制）导致的响应下降通过评价未经提取的 10 ng/mL 纯药物标准品（n=3）峰面积响应来测定 {R_{NES}}。该未经提取溶液作为提取样本在相同的复溶溶剂中被分析。百分基质效应可通过公式[（R_{PES} / R_{NES}）-1] × 100 计算。总处理效率可通过公式（R_{ES} / R_{NES}）× 100 计算。

可见离子抑制效应非常明显，但是可以通过对样品进行固相萃取和使用氘代内标来限制。

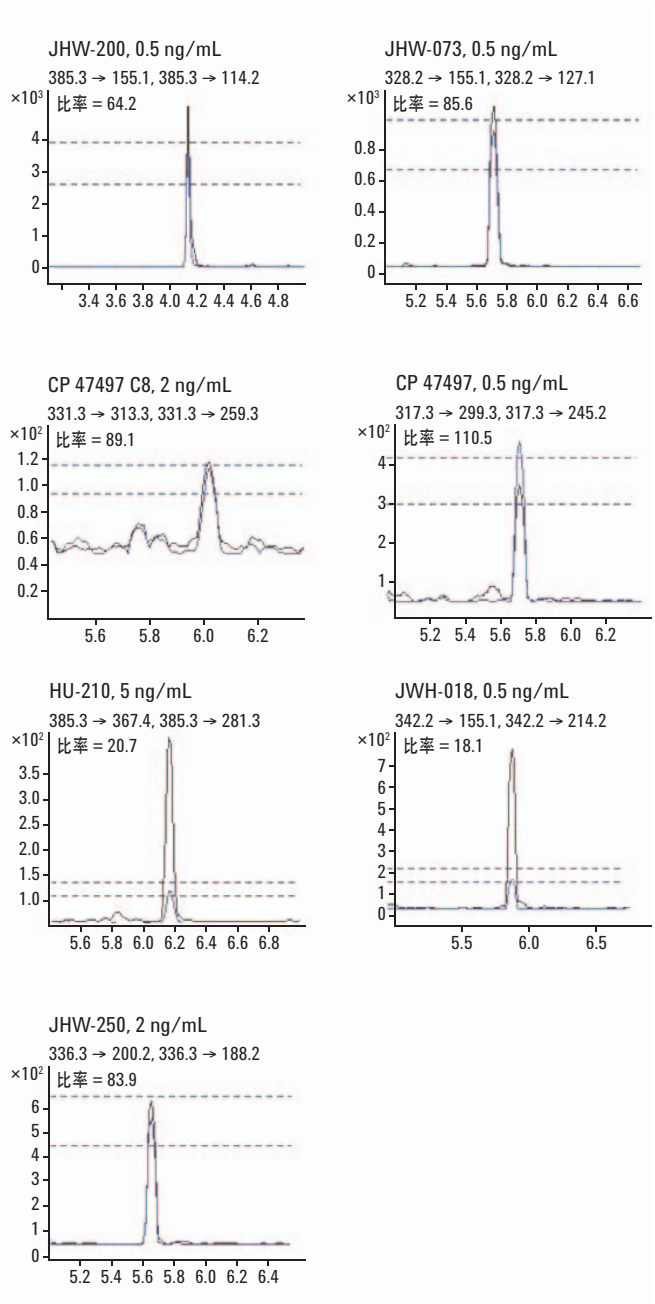


图 2. ±20% 比率的 LOQ 浓度

选择性

使用 Quantisal 装置采集了五个不含药物的唾液样本。各样本取适量按照上述步骤进行提取和分析，以考察内源性化合物或者运输用缓冲液带来的潜在干扰。

另外，在剩余的上述不含药物的唾液中加入常见的滥用药物至浓度为 2000 ng/mL，按照上述步骤提取、分析。

THC	阿米替林
THC-COOH	环苯扎林
11-OH-THC	丙咪嗪
大麻酚	度硫平
大麻二酚	多塞平
可卡因	氟西汀
苯甲酰爱康宁	舍曲林
去甲古柯碱	曲米帕明
可卡乙碱	普罗替林
可待因	氯丙嗪
吗啡	氯米帕明
6-AM	去甲替林
6-AC	帕罗西汀
羟考酮	地昔帕明
羟吗啡酮	溴西泮
氢可酮	阿普唑仑
氢吗啡酮	氯硝西泮
苯丙胺	劳拉西泮
去氧麻黄碱	奥沙西泮
MDMA	地西泮
MDA	咪达唑仑
MDEA	氟西泮
芬特明	氟硝西泮
芬太尼	去甲西泮
苯环利啶	三唑仑
曲马多	替马西泮
卡立普多	硝西泮
甲丙氨酯	氯氮卓
西酞普兰	美沙酮
文拉法辛	

不含药物提取物中未发现内源性干扰；也未发现来自常见药物的外源性干扰，如可在高浓度下被分析的 THC 及其主要代谢物。

误差

制备同时加标所有化合物的浓度为 4 ng/mL 和 40 ng/mL 的样品。每个浓度的样品连续五天（n=6；日内不精密度）按照上述步骤操作（n=30；日间不精密度）进行分析。两个浓度的所有药物检测日内误差小于 9%，日间误差小于 12%（表 2）。

真实样品

样本采自两名当地志愿者，他们曾购买了这些当时在美国仍合法的化合物。受试对象 1 吸食了“Blueberry Posh”，受试对象 2 吸食了“黑曼巴”。使用 Quantisal 唾液收集装置，采集吸食前，以及吸食后不同时间点的样本。采集受试对象 1 吸食后 20 min、40 min、1 h、2 h 和 12 h 的样本；采集受试对象 2 吸食后 20 min、40 min、1 h、5 h 和 12 h 的样本。这些样本在采集后的第二天进行分析，然后剩余样本在 4 °C 贮存一个月后用另一种方法重新分析。一年后，采用相同的程序再测定一遍。当然，现在已经没有可能获得真实样本了，因为现在拥有这些化合物已属非法行为。

两个制备物中检测到的主要活性的化合物是 JWH-018。4 °C 贮存一个月后对样本重新分析，发现目标化合物极其稳定，两次检测浓度几乎完全相同。4 °C 贮存一年后对样本重新分析，发现受试对象 1 的检测结果与一年前基本相同；受试对象 2 的样品检测后发现，那些原来浓度就很低的化合物，现在更低了（见图 3）。

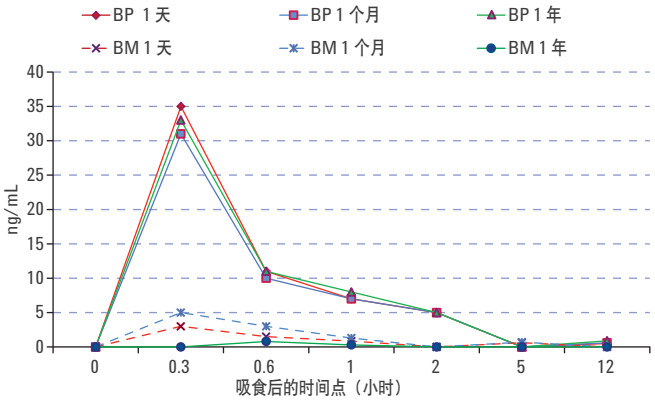


图 3. 4 °C 贮存的真实样本的稳定性

图 4 为提取离子色谱图，显示了吸食 40 min 后样本（受试对象 1）的离子对和围绕定性离子对强度 ±20% 的可接受范围；JWH-018 的浓度是 11 ng/mL。

结论

本文首次报道了唾液中多种“香料”化合物的同时测定。分析步骤适用于采用 Quantisal 装置收集的含有合成大麻素类成分样本的分析，样本中两种浓度采集垫的提取回收率均大于 60%。跟踪两种不同品牌草本产品的单次吸食过程，发现在单次吸食 20 min 后唾液中检测到最高浓度的 JWH-018。即使一年之后，单次吸食“Blueberry Posh”12 h 后的唾液样本中仍可检测到 JWH-018。

更多信息

这些数据代表典型结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

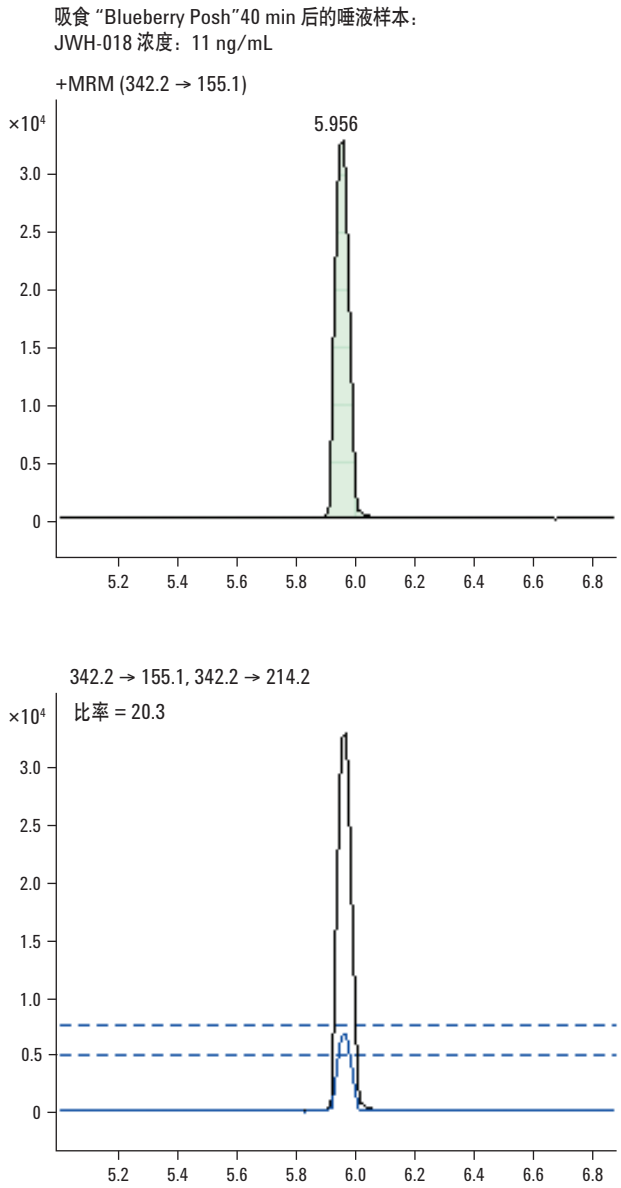


图 4. 受试对象 1 吸食 40 min 后的唾液样本；JWH-018 = 11ng/mL

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 17 日，中国印刷
5990-9679CHCN

Agilent Technologies

采用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 和 Agilent Poroshell 120 色谱柱对全血中的丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡进行 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医学与药物测试

作者

Irina Dioumaeva
安捷伦科技有限公司

摘要

法医和疼痛科实验室进行全血中丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的检测时，需要一种能在浓度低于 1 ng/mL 的水平内可靠检测这些化合物的分析方法。一种简单的样品净化步骤，结合使用离子对 468.2→55.1 和 414.2→83.1 的 LC/MS/MS 方法，可实现两种分析物的检测限（LOD）低于 0.1 ng/mL。每种分析物校正曲线的线性范围为 0.2 到 20 ng/mL，其 R^2 等于或大于 0.999。采用安捷伦新一代产品分析可获得更高的检测灵敏度。这些产品包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂、Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.7 µm 表面多孔填料 LC 柱、Agilent 1200 Infinity LC 系统、以及配备了安捷伦喷射流技术（AJST）增强型电喷雾离子源的 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 系统。

Agilent Technologies

引言

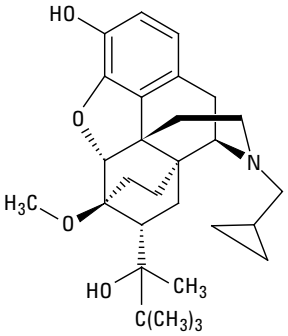
丁丙诺啡是一种半合成的鸦片样药物，用于治疗慢性疼痛，以及作为美沙酮的替代品治疗阿片成瘾。作为镇痛剂，丁丙诺啡的效果大约是吗啡的 25 到 40 倍。丁丙诺啡的结构与吗啡相似，但疏水性更强（见图 1）。丁丙诺啡在肝脏中存在 N-脱烷基化反应，产生其主要活性代谢物——去甲丁丙诺啡。丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡在血液中的浓度非常相近，50% 以上病例中的浓度低于 1 ng/mL（Selden 等，2011），给分析人员的检验带来了极大的挑战。此外，由于这些分析物分子结构稳定性强，碰撞诱导裂解产生的碎片量少，因此对这些化合物进行 MS/MS 分析很困难。为了实现检测灵敏度低于 1 ng/mL，检测这些化合物的分析方法不仅要有出色的 MS 性能，还要有一个回收率高、离子抑制低的有效样品净化程序。我们使用 SPE 处理的全血提取物洁净度高，较容易地实现了检测限低于 0.1 ng/mL。与其它聚合物吸附剂不同，所有 Agilent Bond Elut Plexa 系列产品的颗粒均具有不含氨基的羟基化表面，消除了对蛋白质的吸附，从而获得了最低的离子抑制和最高的检测灵敏度。又由于填料粒径分布窄且没有粉末造成堵塞，还实现了高流速和良好的重现性。

利用该方法可实现分析物的良好分离和极佳的峰形，这是采用 Agilent Poroshell 120 系列色谱柱进行分析的特色。采用表面多孔的 2.7 µm 填料，这些色谱柱具有与亚 2 µm UHPLC 色谱柱相似的柱效，但背压却降低了约 40%。这就允许用户甚至可以使用 400 bar LC 系统来提高分离度，并且通过使用更高的流速来缩短分析和再平衡时间。

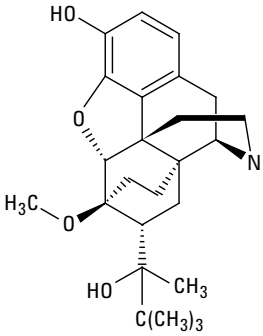
本文定量分析使用的经鉴定具有最高丰度的新离子对是 468.2 > 55.1（丁丙诺啡）和 414.2 > 83.1（去甲丁丙诺啡）。该方法仅需 0.5 mL 血样，采用 10 µL 较低的进样体积和提取时 5 倍预浓缩，即可在 0.2 ng/mL 浓度时实现良好的信噪比：丁丙诺啡为 84 : 1，去甲丁丙诺啡为 20 : 1（见图 2）。

实验部分

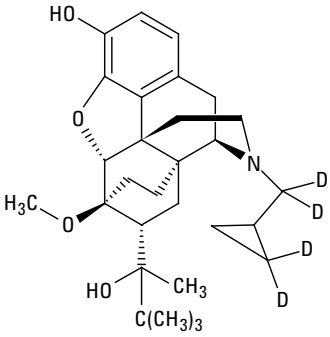
分析物



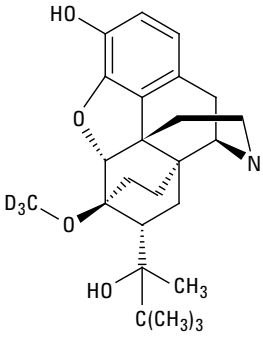
丁丙诺啡
$C_{29}H_{41}NO_4$ M.W. 467.65
Log P 4.9-5.0
pKa 8.3



去甲丁丙诺啡
$C_{25}H_{35}NO_4$ M.W. 413.55
Log P 3.4-3.8



丁丙诺啡-D_4
$C_{29}H_{37}D_4NO_4$ M.W. 471.62



去甲丁丙诺啡-D_3
$C_{25}H_{32}D_3NO_4$ M.W. 416.53

图 1. 分析物丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡及其结构。log P 和 pKa 值来自 SRC 和 PubChem

药物标准品为 1 mg/mL （丁丙诺啡、去甲丁丙诺啡）和 100 µg/mL （丁丙诺啡-D_4 和 去甲丁丙诺啡-D_3）的甲醇溶液，购自 Cerilliant 公司。

材料和仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱，30 mg，3 mL（部件号 12108303）
- 安捷伦真空多管装置 VacElut 20（部件号 12234100）
- 安捷伦活塞阀（部件号 12234520）
- 安捷伦硅烷化自动进样瓶，2 mL（部件号 5183-2072）
- 安捷伦样品瓶内插管，250 µL， 脱活玻璃，聚合物底座（部件号 5181-8872）
- 安捷伦螺旋盖，用于 AS 样品瓶（部件号 5182-0717）

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18，3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱（部件号 699975-302）
- Agilent 1260 Infinity LC 系统（G1379B 微量脱气机、1312B 低延迟体积二元泵、G1367E 自动进样器、G1330B 柱温箱）

MS

- Agilent 6460A 三重四极杆 LC/MS 系统，配备 AJST 电喷雾离子源

样品制备

预处理

1. 将适量 ISTD 加入0.5 mL 血样中，使浓度为 10 ng/mL，或采用 0.1 M 磷酸盐缓冲液（pH 6.0）配制 10 ng/mL 的 ISTD 溶液，并在每份血样中加入 0.5 mL 此内标缓冲液。推荐使用甲醇清洗并晾干的 12 × 75 mm 玻璃管
2. 加入 ISTD 后，加入 2 至 2.5 mL 磷酸盐缓冲液（血样至少被稀释了 5 倍）
3. 涡旋后离心，使沉淀完全

萃取

1. 采用 0.5 mL 甲醇活化 Bond Elut Plexa PCX 小柱浸泡，然后使其自然滴落
2. 上样/使用 Pasteur 玻璃吸量管吸取上清液
3. 淋洗 1：2 × 2 mL 2% 甲酸溶液
4. 淋洗 2：3 mL 甲醇/2% 甲酸溶液（70 : 30）
5. 真空干燥 5-10 min（10-15 in Hg）
6. 用 1.5 mL 乙酸乙酯/异丙醇/氨水（80/20/5）混合液洗脱。在洗脱即将开始前加入氨水。将洗脱液分成两等份，依次浸泡吸附剂。关闭活塞阀浸泡约 0.5 min 后，打开活塞阀让洗脱液在重力作用下滴入收集瓶中。当洗脱液不再滴落时，使用低真空抽取吸附剂小孔中的洗脱液
7. 45 °C 下氮气吹干
8. 用 0.1 mL 初始流动相（15% 甲醇、85% 水、0.1% 甲酸）复溶残渣，涡旋后转移至带聚合物底座的样品瓶内插管中

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1% 甲酸水溶液	
流动相 B	0.1% 甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间（min）	% B
	0.0	15
	2.0	70
	2.1	95
	5.5	95
	5.51	15
停止时间	5.6 min	
后运行时间	2 min	
最大泵压	400 bar	
进样体积	10 µL	
带针头清洗的进样		
针头清洗	用甲醇-水（95 : 5）冲洗针座 10 s	
禁止重叠进样模式		
无自动减小延迟体积		

MS 条件

ES 离子源参数

离子化模式	正离子
毛细管电压	2800 V
干燥气流量	10 L/min
干燥气温度	350 °C
雾化气压力	35 psi
鞘气流量	12 L/min
鞘气温度	350 °C
喷嘴电压	0 V

MS 参数

扫描方式	MRM
预运行程序	SCP_MSDiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.8 min - 转换阀至 MS
EMV (+) 增益	400 V

表 1 展示了目标化合物及其同位素内标物 MRM transitions 的定量离子和定性子离子。

表 1.　　MRM transitions

化合物名称	母离子	MS1 的分辨率	子离子	MS2 的分辨率	碎裂电压	碰撞能量
丁丙诺啡	468.3	Unit	55.1	Wide	200	62
丁丙诺啡	468.3	Unit	396.2	Wide	200	45
丁丙诺啡-D_4	472.3	Unit	59.1	Wide	200	62
丁丙诺啡-D_4	472.3	Unit	400.2	Wide	200	45
去甲丁丙诺啡	414.3	Unit	83.1	Wide	188	60
去甲丁丙诺啡	414.3	Unit	57.1	Wide	188	50
去甲丁丙诺啡-D_3	417.3	Unit	83.1	Wide	188	60
去甲丁丙诺啡-D_3	417.3	Unit	57.1	Wide	188	50

结果与讨论

在低 pH 值条件下，丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的叔胺官能团被质子化，通过疏水作用和强阳离子交换作用，它们在 Agilent Bond Elut Plexa PCX 聚合物吸附剂上获得较强的保留。

使用 100% 甲醇淋洗会从 SPE 柱上冲下部分分析物而造成损失。有效去除基质干扰物而又不损失样品的最佳淋洗条件为甲醇-2% 甲酸溶液（70 : 30）。在有机洗脱液中加入强碱以破坏分析物和强阳离子交换吸附剂之间的离子相互作用。在样品洗脱开始前添加 5% 氨水到乙酸乙酯：异丙醇混合洗脱液（80 : 20）中，丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡可以得到最佳的回收率。推荐使用两步洗脱法并结合浸泡步骤，以增强溶剂-分析物的相互作用并提高样品回收率。

由于疏水性强，丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡可能粘附到玻璃器皿、LC 管路和进样器部件中，这也是为什么我们推荐在 LC 方法中使用 95% 甲醇冲洗色谱柱和使用甲醇-水（95 : 5）冲洗针座的原因。采用去活处理的样品瓶/内插管和甲醇清洗并晾干的玻璃器皿（STD 和 ISTD 稀释液用的管和瓶子）也确保了结果的良好重现性。

LC 分离开始时特意以相对较低比例的有机相（15%）进行洗脱，以使血样中的盐和其它极性化合物在样品运行初期即被洗脱下来。0.8 mL/min 的流速使分析时间和再平衡时间都较短。每次样品运行均将开始部分的洗脱液（0 到 1.8 min）导入废液中，以最大程度地降低对离子源的污染。1.8 min 时开始数据采集，即转换阀切换后立即开始。

图 2 为丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡在 0.2 ng/mL LOQ 时及其氘代内标物在 10 ng/mL 时的色谱图。

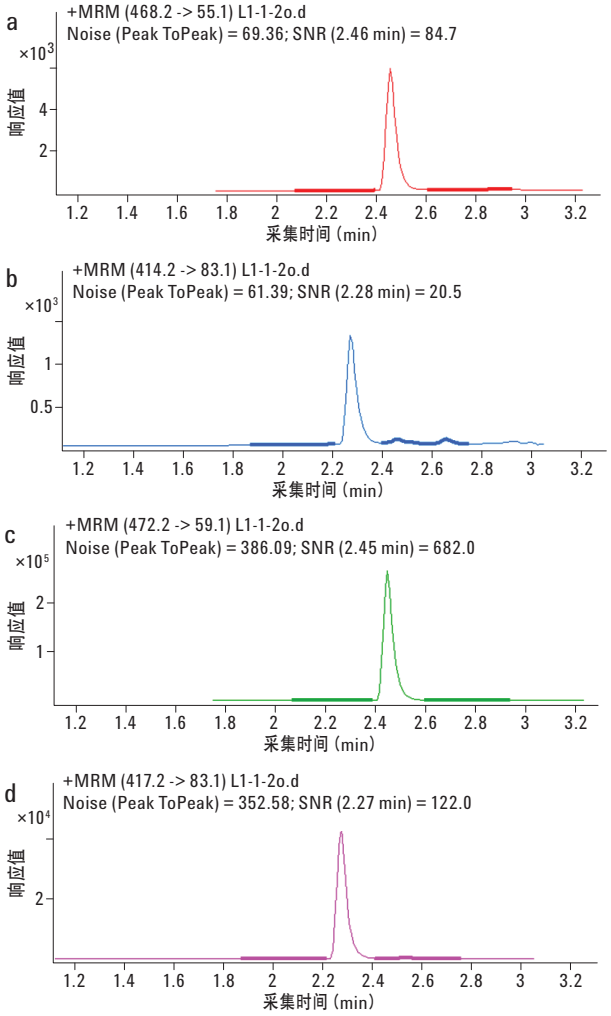


图 2.　　MRM 萃取离子色谱图：a – 丁丙诺啡，b – 去甲丁丙诺啡（均为 0.2 ng/mL），c – 丁丙诺啡-D_4，d – 去甲丁丙诺啡-D_3（均为 10 ng/mL）。全血提取物经 Agilent Bond Elut Plexa PCX 处理，采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm，2.7 µm 色谱柱分析。噪音区域加粗显示

丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡这两种化合物分子离子的高稳定性给 MS/MS 检测造成了困难，这导致许多研究人员采用 SIM 模式对它们进行定量（Scislowski et al，2005；Concheiro et al，2009），或者在 SRM 模式下采用较高的碰撞能量（无碎片）监测分子离子的转换离子（Kronstrand et al，2003；Selden et al，2011）。与选择性更强的母离子-子离子对定量相比，这种方法可靠性差。并且，这种方法有较低的信噪比，从而具有较高的 LLOQ。利用 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 系统（表 1）在高碰撞能量水平下获得了一种新的稳定碎片类型，两种分析物在 LLOQ 为 0.2 ng/mL 时均可实现可靠定量。丁丙诺啡丰度最高的碎片是 *m/z* 55.1 的甲基环丙基（C_4H_7）基团。它通过丁丙诺啡-D_4 的 *m/z* 59.1 碎片得以鉴定确认。去甲丁丙诺啡丰度最高的碎片子离子（*m/z* 83.1）可能来自母离子的侧支链，包括叔丁基基团 $(CH_3)_3C$。与最佳碰撞能量下获得的最常用碎片子离子相比，丁丙诺啡的 *m/z* 55.1 子离子的丰度比 *m/z* 396.2 高 8 倍，而去甲丁丙诺啡 *m/z* 83.1 子离子的丰度比 *m/z* 101.1 高 2 倍。

表 1 中列出的 MRM transitions 是两种目标化合物及其氘代 ISTD 的一个定量和一个定性子离子。Agilent MassHunter 软件自动计算定性离子的比率，突出显示那些超出可接受范围的离子。

常态或动态 MRM 采集模式在这种方法下均可使用。

LLOQ 水平为 0.2 ng/mL 时的信噪比分别为丁丙诺啡 84 : 1，去甲丁丙诺啡 20 : 1（图 2，a 和 b）。这证明了本样品净化程序的高效性和 6460 三重四极杆质谱出色的检测灵敏度，从而能够实现在低于 0.1 ng/mL 的 LOD 下检测这些分析物。

图 3 展示了 5 种浓度全血标样中提取的丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的典型的校正曲线。校正标样由加标分析物至全血中制得，使浓度分别为 0.2、1、5、10 和 20 ng/mL。添加氘代内标物的浓度为 10 ng/mL。每条曲线出色的线性拟合（$R^2 > 0.999$）证明了本方法线性良好。未采用加权处理，曲线拟合中包括了起点数据。

表 2 展示了五个全血样品的回收率（准确度）和精密度（CV，或 RSD）数据，其每个分析物的加标浓度均为 1 ng/mL。通过比对加标混合标样获得的校正曲线进行定量分析（图 3）。

表 2.　每个分析物在浓度为 1 ng/mL 时进行的方法验证，n = 5

	准确度（%）	CV %
丁丙诺啡	94.2	0.6
去甲丁丙诺啡	103	0.2

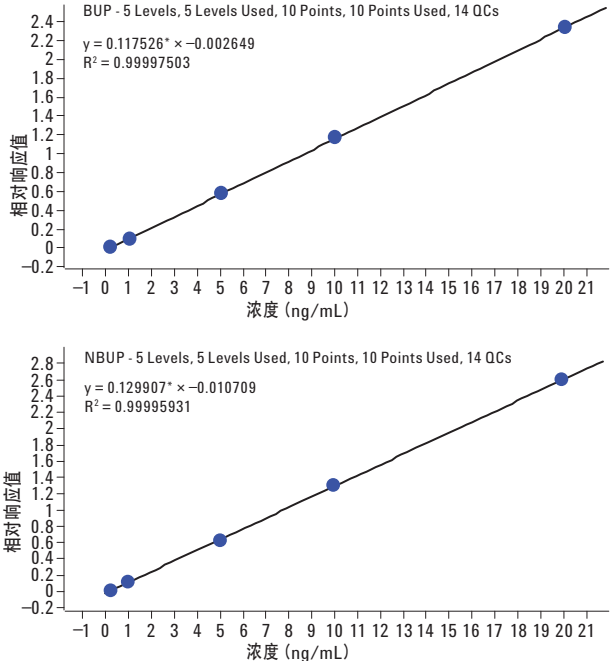


图 3.　全血提取物中丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的典型校正曲线。浓度范围 0.2 至 20 ng/mL。线性拟合 R^2>0.999

结论

本文介绍了一种简单的、固相萃取结合 LC/MS/MS 检测的方法，实现了全血中浓度低于 0.2 ng/mL 的丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的定量分析。本方法专为安捷伦 1100 和 1200 LC 系列仪器的用户开发，因为其 LC 系统的背压不能超过 400 bar。如采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统仪器运行本方法，离子源参数可以很容易修改。由于样品提取物的净化度高，同时使用经高丰度碎片子离子重新鉴定的离子转换通道的耐用的 MS 检测，使本方法获得了较低的检测限。

参考文献

Baselt, R. (2008) Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.

Concheiro, M., Shakleya, D. M. and Huestis, M. A. (2009) Simultaneous quantification of buprenorphine, norbuprenorphine, buprenorphine-glucuronide and norbuprenorphine-glucuronide in human umbilical cord by liquid chromatography-tandem mass spectrometry Forensic Science International, 188 (1-3): 144–151.

Kronstrand, R., Selden, T. G. and Josefsson, M. (2003) Analysis of buprenorphine, norbuprenorphine, and their glucuronides in urine by liquid chromatography–mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 27: 464–470.

Miller, E. I., Torrance, H. J. and Oliver, J. S. (2006) Validation of the Immunalysis microplate ELISA for the detection of buprenorphine and its metabolite norbuprenorphine in urine. Journal of Analytical Toxicology, 30:115–119.

Moody, D. E., Slawson, M. H., Strain, E. C., Laycock, J. D., Spanbauer, A. C. and Foltz, R. L. (2002) A liquid chromatographic–electrospray ionization-tandem mass spectrometric method for determination of buprenorphine, its metabolite, norbuprenorphine, and a coformulant, naloxone, that is suitable for in vivo and in vitro metabolism studies. Analytical Biochemistry, 306: 31–39.

Moore, C., Coulter, C. and Crompton, K.（2007）液相色谱/三重四极杆质谱测定尿样中的丁丙诺啡、去甲丁丙诺啡及其葡糖苷酸产物。安捷伦应用报告 5989-7072CHCN。安捷伦科技有限公司。

Øiestad, E. L., Johansen, U., Øiestad, A. M. L. and Christophersen, A. S. (2011) Drug screening of whole blood by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 35: 280-293.

Scislowski, M., Piekoszewski, W., Kamenczak, A. and Florek, E. (2005) Simultaneous determination of buprenorphine and norbuprenorphine in serum by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 29: 249–253.

Selden, T., Roman, M., Druid, H. and Kronstrand, R. (2011) LC–MS–MS analysis of buprenorphine and norbuprenorphine in whole blood from suspected drug users. Forensic Science International, 209: 113–119.

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们网站：www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012 年 2 月 28 日，中国印刷
5990-9930CHCN

Agilent Technologies

快速、稳定、灵敏地测定头发中的 11-羟基-Δ^9-四氢大麻酚-9-羧酸（THCA）

应用报告

法医/兴奋剂控制

作者

David Engelhart
Omega Labs Inc.
摩加多尔, 俄亥俄州 44260
美国

Fred Feyerherm
Stephan Baumann
Bernhard Rothweiler
安捷伦科技公司
圣克拉拉，加利福尼亚州 95051
美国

摘要

本文介绍了一种使用色谱柱切换和反吹技术开发的头发中 THCA 大麻代谢物的快速、稳定的测定方法，运行时间和循环时间分别为 7 min 和 9 min。方法检出限为 0.002 pg/mg，定量限为 0.01 pg/mg。

前言

通过检测头发来监测滥用药物已有 50 多年的历史了，很大程度上是由于其能够监测很长时间内的用药情况，与其他生物基体相比，很多药物能够在头发中得到良好保存。头发检测在犯罪调查中广泛使用，比如监视假释犯的戒毒情况，查证吸毒史，识别吸毒诱导型性侵犯等。头发药检还普遍用于筛查和监测下列人群的涉毒情况，如公司雇员、参与药物治疗的患者和涉及孩子抚养权的各方。工作场所执行程序即包括头发药检，其优点为样品易于采集、难于造假以及可监测毒品摄入时间更长。

大麻是法医和毒品筛查中经常检测的药物之一。其母体化合物四氢大麻酚(THC)在头发中含量较高，但是为消除吸抽大麻引起的环境空气污染，经常选取其代谢产物 11-羟基-Δ^9-四氢大麻酚-9-羧酸（THCA）作为检测物。美国药物滥用和精神健康服务管理局(SAMHSA)尚未通过相应的工作场所头发检测标准，但建议的nor-9-羰基-Δ_9-四氢大麻酚指导限值 0.05 pg/（mg 头发），这一限值将成为该监管机构进一步研究和分析的主题。毛发测试学会建议的 THCA 定量限为 LOQ ≤ 0.2 pg/（mg 头发）。

Agilent Technologies

该应用报告介绍了一种使用 Agilent 7890A 气相色谱联用 7000B 三重串联四级杆质谱系统开发的测定头发中 THC 代谢物的方法。该方法使用二维气相色谱和负离子化学电离源（CI）MS/MS，在多反应监测（MRM）模式下（也称为 SRM，选择性反应监测模式）获得了优异的灵敏度和快速的检测速度。该方法改良于之前的报道过的 GC/MSD 方法【1】，充分利用了三重串联四级杆质谱的低化学背景和高灵敏度的优势。利用反吹提高了方法的耐用性，低热容（LTM）色谱柱模块加速了色谱分析过程，使运行时间仅为 7 min，循环时间也仅为 9 min。建立在三重串联四级杆质谱上的 MRM MS/MS 分析表现出了卓越的灵敏度，LOD 和 LOQ 分别仅为 0.002 pg/mg 和 0.01 pg/mg。

实验部分

标准和试剂

使用三-氘代 THCA 作为内标物(浓度为 100 µg/mL 的甲醇溶液)，无同位素标记的 THCA（浓度为 100 µg/mL 的甲醇溶液）购自 Cerilliant 公司, (Round Rock, TX)。头发中的内标浓度为 0.05 pg/mg。

甲醇、乙腈、甲苯、乙酸乙酯、正己烷、冰醋酸和二氯甲烷购自 Spectrum Chemicals 公司(Gardena, CA)。所有溶剂均为 HPLC 级或更高，所有化学试剂均为ACS 级。Bond Elut Certify I 固相萃取柱(130 mg)购自安捷伦科技公司(Walnut Creek, CA)，或者使用 Clean Screen ZSTHC02 萃取柱(200 mg) ，购自 United Chemical Technologies, Inc. (Bristol, PA)。衍生化试剂全氟丙酸酐(PFPA)和六氟异丙醇(HFIP)分别购自 Sigma–Aldrich 公司 (St. Louis, MO) 和 Campbell Science 公司 (Rockton, IL)。

仪器

实验使用配备多模式进样口（MMI）和 LTM 系统的安捷伦 7890N 气相色谱及安捷伦 7000B 三重串联四级杆质谱联用系统。使用三通管 Purged Ultimate Union 连接预柱实现反吹和 Deans Switch 连接两个低热容（LTM）色谱柱，实现二维色谱模式运行（图 1）。仪器条件列于表1。

表 1. 安捷伦 7890N/7000B 气相色谱和三重串联四级杆质谱条件

GC 运行条件	
预柱	1 m × 0.15 mm × 1.2 µm DB-1 (部件号 12A-1015)
分析柱	
色谱柱 1	15 m × 0.25 mm × 0.25 µm DB-1ms LTM 色谱柱模块 (部件号 122-0112LTM)
色谱柱 2	15 m × 0.25 mm × 0.25 µm DB-17ms LTM 色谱柱模块 (部件号 122-4712LTM)
进样体积	2 µL
进样口温度	250 °C 恒温
进样口模式	0.75 分钟脉冲不分流，35 psi
柱箱温度	
GC 柱箱温度	250 °C(恒温)保持 7 min
色谱柱 1 LTM 模块	100 °C 保持 50 s
	从 100°C 以 200 °C/min 速率升至 210 °C
	从 210 °C 以 10°C/min 速率升至267 °C
	267 °C 保持 2 min
色谱柱 2 LTM 模块	100 °C 保持 324 s
	从 100 °C 以 200 °C/min 速率升至 230 °C
	从 230 °C 以 10 °C/min 速率升至 240 °C
	240 °C 保持 2 min
载气	氦气，恒压 预柱: 1 psi;色谱柱 1: 26.6 psi; 色谱柱 2: 19.6 psi
传输管线温度	300 °C
质谱条件	
调谐	自动调谐
EMV Delta	1200 V
数据采集参数	NCI; 多反应监测模式 (MRM)
试剂气体	氨， 35%
碰撞气体	氩气， 恒流， 0.9 mL/min
淬灭气体	氦气， 恒流，0.5 mL/min
溶剂延迟	6.2 min
MS 温度	离子源 150 °C; 四级杆 150 °C

样品制备

样品按前述方法制备【2】。将校准样，质控样或 20 mg 头发样本称量至硅烷化玻璃试管中，用 1.5 ml 二氯甲烷进行清洗。弃去洗液，将头发晾干。按 0.05 pg/mg 的浓度向头发样本中加入 THCA-d3 内标物。分别向头发中按 0.002, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 和 0.5 pg/mg 的比例加入无同位素标记的 THCA 校准标准系列。

向试管中加入 0.5 mL 去离子水和 0.5 mL 2N 的 NaOH，在 75 °C 的温度下加热 15 min。样品冷却后在 2500 rpm 速度下离心 15 min。将上清液倒入到预先装有 1 ml 冰醋酸和 3 ml 1M 冰醋酸和 2 ml 0.1M 醋酸钠组成的缓冲体系中(pH 4)。加盖混匀。

SPE 柱预先经正己烷/乙酸乙酯(75:25, v/v; 2 mL)，3 ml 甲醇，3 ml 去离子水和 1ml 0.1M 盐酸进行活化处理。将酸化的样品加到 SPE 柱上，待干。然后用 2-3 ml 去离子水淋洗 SPE 柱，静置 5 min。再用 0.1 M 盐酸/乙腈(70:30 v/v; 3 mL)继续淋洗 SPE 柱，在 30 psi 下静置 10 min。最后用正己烷/乙酸乙酯(75:25 v/v; 3 mL)洗脱，将 THCA 洗脱到硅烷化玻璃试管中。

40 °C 下将洗提液氮吹至干。使用 PFPA (70 µL) 和 FIP (30 µL)进行衍生化。将混合液转移到自动进样器上装有玻璃内插管和密封盖的样品瓶上。将样品瓶在 80 °C 加热 20 min，在室温下静置 10 min。在真空腔中将洗提液蒸发至干。最后用甲苯(50 µL)复溶，然后用 GC/MS 分析。

分析参数

安捷伦三重串联四极杆 GC/MS 的参数如表 2 所示。

表 2. Agilent 7000 B 三重串联四极杆 GC/MS 的分析参数

化合物	RT (min)	MRM	驻留时间 (ms)	碰撞能量 (EV)
THCA*	6.714	620→492	50	5
		620→383	50	5
THCA-d3	6.710	623→495	20	5
		623→386	20	5

*11—羟基—Δ^9—四氢大麻酚—9—羧酸

结果

使用中心切割的二维气相色谱

使用双色谱柱分离背景和目标化合物作为一项完善的技术广泛用于实现基体干扰和目标物的优异分离。一旦被分析物的保留时间在第一根色谱柱上得到确认，气路转换开关（Deans Switch）就会在那个时间开启并将气流切换到第二根色谱柱，并在短时间后关闭。这种切换可使第一根色谱柱上的流出物形成窄的中心切割“窗口”，在保证包含被分析物的同时，确保流入背景最小化，以在第二根色谱柱上实现进一步分离（图 1）。应使两根色谱柱的固定相尽量不同，以使双柱配置的作用达到最大化。

优异的稳定性和分析速度

反吹功能和低热容(LTM)色谱柱模块相结合使该方法与传统单色谱柱方法相比性能更稳定，分析速度更快。三个相互独立的程序压力控制区可与三个相互独立的程序温度控制区结合（图 1）使用。预柱和第一根 LTM 色谱柱装填非极性 DB-1ms 固定相，第二根 LTM 色谱柱装填极性较强的 DB-17ms 固定相。中心切割视窗宽度仅为 0.2 min (5.5 到 5.7 min)。

一种独一无二的系统，用于头发中 THCA 的高效快速检测

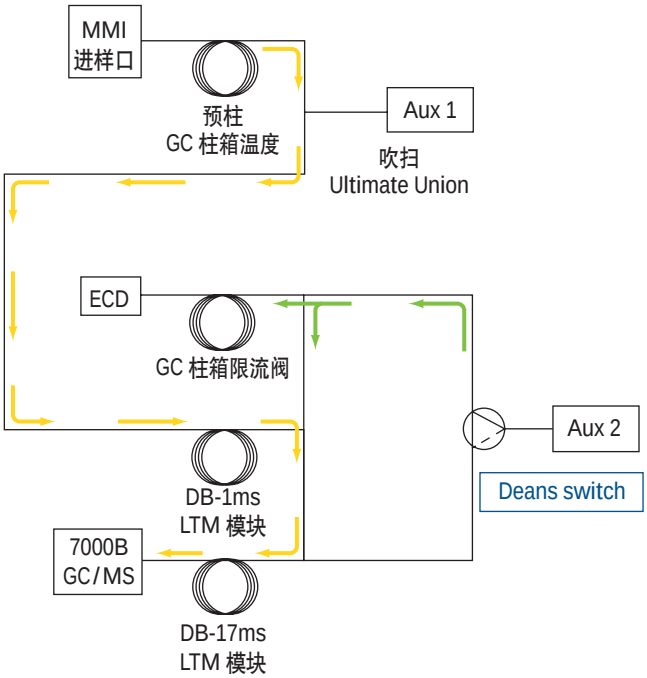


图 1. 用于 THCA 方法开发的色谱/质谱系统结构图

预柱和辅助压力控制模块(AUX EPC)为系统提供反吹功能以保护 LTM 分析柱。运行过程中，预柱以 1 psi 恒压模式进行反吹。在最初的 0.75 min，进样口的脉冲压力将反吹覆盖。使用反吹防止高沸点化合物在色谱柱上聚集，从而减少保留时间漂移、色谱峰变形和化学噪声，提高了定量的准确性；反吹还降低了离子源遭受污染的几率以及随之而来的清洗频率，同时缩短了运行时间。

方法同样将 LTM 色谱柱模块外接到 GC 色谱柱箱，可以分别对两个分析柱进行独立优化的温度控制（图 2）。这些独特的模块设计使迅速升温和降温成为可能。LTM 色谱柱模块可随时接入到安捷伦气相色谱，无需对进样口和自动进样器或检测器进行任何改变，而且可以通过 GC 软件进行控制。

这种独特的反吹和 LTM 技术增强了方法的性能，在 7 min 运行时间和 9 min 循环时间内即可获得准确的定量结果和卓越的灵敏度（参见下文）。

独特的 LTM 色谱柱模块确保系统实现快速升温和降温

图 2.　低热容(LTM)色谱柱模块与安捷伦 7890A 嵌接

卓越的灵敏度和准确的定量性能

该方法检出限（LOD）为 0.002 pg/mg，远低于推荐的限值 0.05 pg/mg，充分说明了其卓越的灵敏度（图 3）。方法的准确度也表现不俗，从 0.002 到 0.5 pg/mg范围内的 R^2 为 0.995 (图 4)。方法定量限为（LOQ）0.01 pg/mg，同样比毛发检测协会 (图 5)推荐的指导值 0.2 pg/mg 低一个数量级之多。方法同样提供了适应性定量分析报告，包括保留时间（包括保留时间上下限），响应水平，定量离子比（包括比值上下限）和计算结果。样品和 THCA-d3 内标物的总离子流图和定量离子及限定离子的 MRM 谱图同样列于报告中（图 6）。

LOD 为 0.002 pg/mg

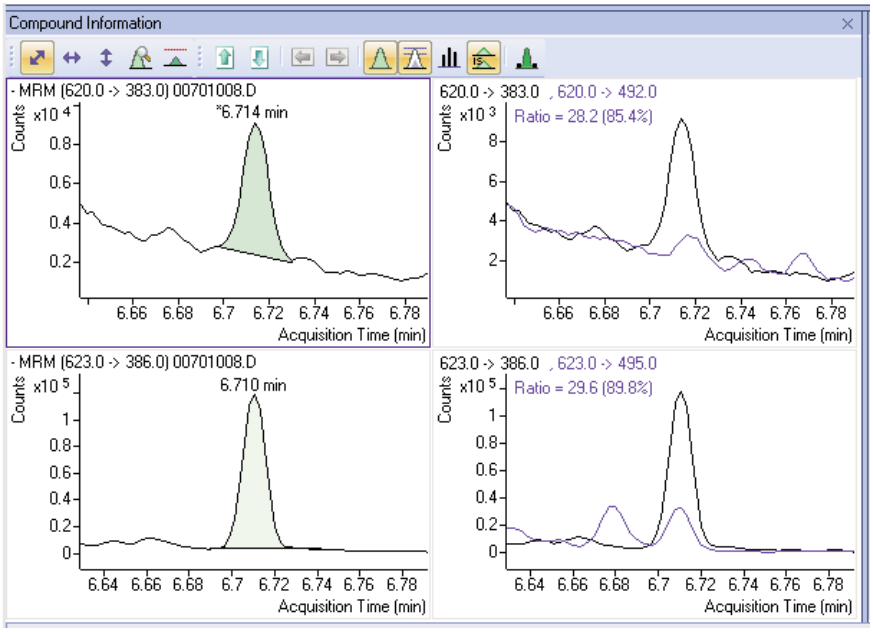


图 3. 头发样品加标 0.002 pg/mg LOD 水平的 THCA（上排） 和内标物（下排）的定量离子 MRM 谱图（左列）和定量离子及限定离子 MRM 叠加谱图（右列）

可靠的校准结果

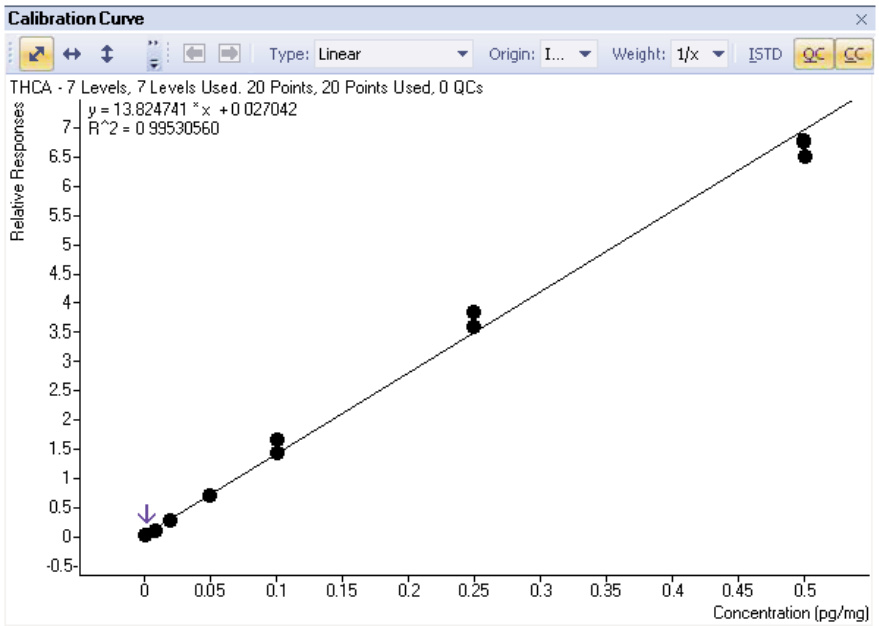


图 4. 头发样品 THCA 加标量分别为 0.002, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 和 0.5 pg/mg 的校准曲线

LOQ 为 0.01 pg / mg

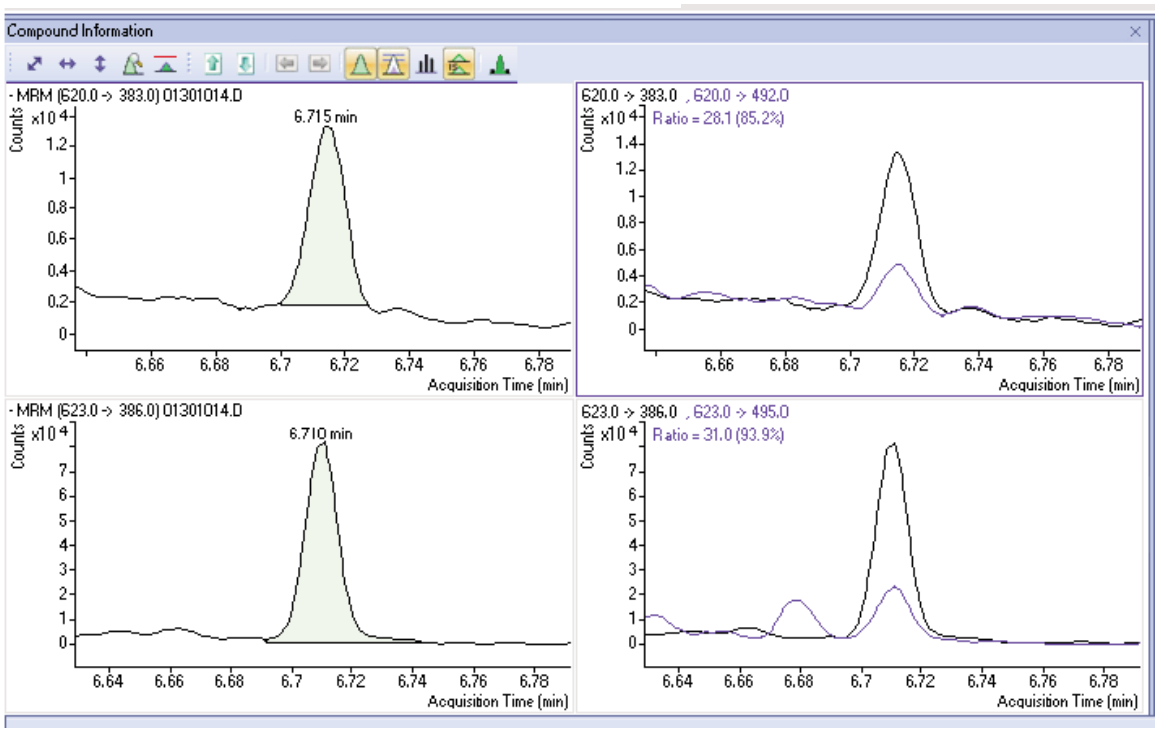


图 5. 头发样品加标 0.01 pg/mg LOQ 水平的 THCA（上排）和内标物（下排）的定量离子 MRM 谱图（左列）和定量离子及限定离子 MRM 叠加谱图（右列）

数据文件	01401015.D	样品瓶	14
操作者	DATASYSTEM01/Admin	稀释倍数	0.0
采集方法名称		样品信息	
数据采集时间	2010-10-08 16:24	校准最近更新时间	2010-11-28 09:34
样品名称和路径	0.01 pg/mg, D:/MassHunter/GCMS/1/data/PFAA Curve Extracted/		

化合物	Signal	RT	RT 范围	响应	QRatio	比值范围	计算结果
THCA-d3	623.0 -> 386.0	6.71		82558		35770 - 143081	
	623.0 -> 495.0			24962	30.2	23.1 - 42.9	
THCA	620.0 -> 383.0	6.71	6.38 - 7.05	10999			0.008
	620.0 -> 492.0			3908	35.5	23.1 - 42.9	

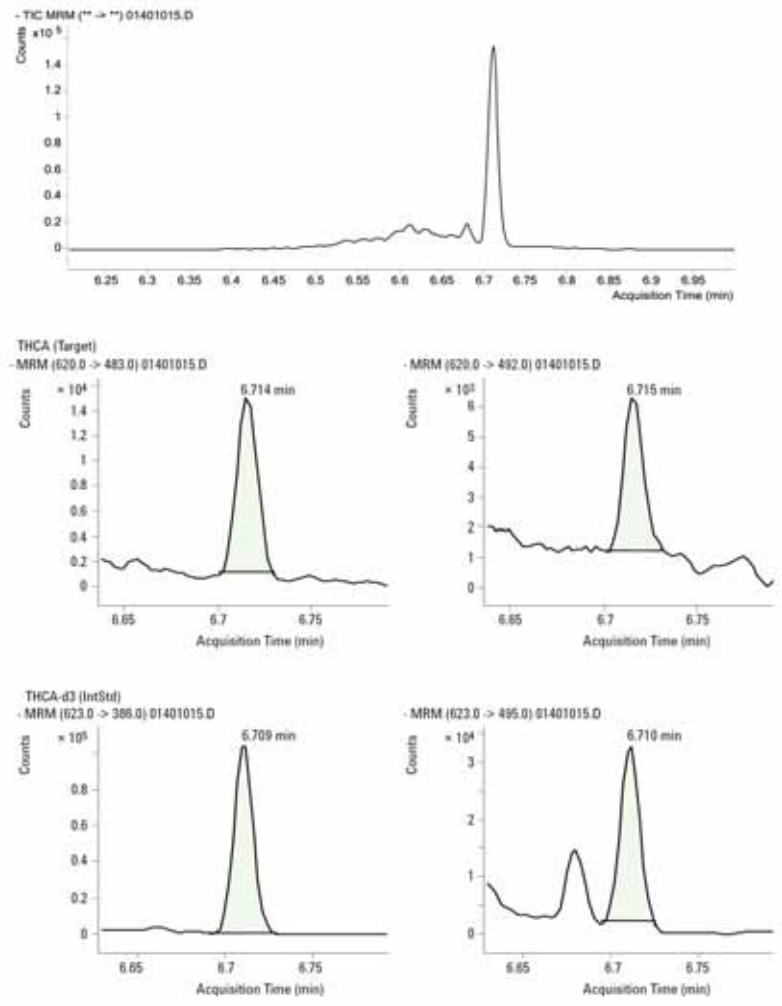


图 6.　0.01 pg/mg（定量限）加标头发样本的定量分析报告

结论

中心切割是一种经过时间考验的技术，能提高色谱分离性能，在本文介绍的方法中，将其与微板流路辅助反吹和低热容色谱柱程序升温模块相结合，发挥了更高的作用，运行时间 7 min，循环时间 9 min 的时间内能够提供对头发中 THCA 分析卓越的灵敏度（LOD 0.002 pg/mg；LOQ 0.01 pg/min）和稳定性。

参考文献

1. F. Feyerherm, R. Lowe, J. Stuff, D. Singer, “Rapid Multidimensional GC Analysis of Trace Drugs in Complex Matrices”, Gerstel publication AN-2007-8.
2. C. Moore, S. Rana, C. Coulter, F. Feyerherm, H. Prest, “Application of Two-dimensional Gas Chromatography with Electron Capture Chemical Ionization Mass Spectrometry to the Detection of 11-nor-D9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA) in Hair”, J. Anal. Toxicol. 30, 171–177 (2006).

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的直接或间接损失不承担任何责任。

本书中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

2011年3月21日中国印刷
5990-7535CHCN

Agilent Technologies

快速耐用的检测血中THC及其代谢物的方法

应用报告

法医/毒品控制

作者

Stephan Baumann
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara CA 95051
USA

摘要

使用SPE萃取及带反吹功能的GC/MS/MS，开发了一种耐用的检测血中THC及其代谢物的方法。THC 和11-OH-THC的定量动态线性范围为0.1-50 ng/mL，THCA的则为1-100 ng/mL。分析运行时间6 min，实验循环周期8 min。

引言

过去十年里，已进行了大量有关服用大麻对道路安全影响的研究。特别是研究了吸食大麻对驾驶能力的影响，其流行病学研究及相关大麻检测技术工作也多有发表。因此，一些国家针对药后驾驶（DUID）进行立法，措施各不相同。虽然已有许多类型的体液样品用于大麻检测，但血液样品分析仍被认为是能够发现这种危害最可靠的方法。血液中活性四氢大麻酚（THC）的检测也被雇主用于判断雇员服用大麻对工作表现的损害。气相色谱-质谱（GC/MS）联用是检测和定量分析血中THC及其代谢物的标准方法。

可靠检测血中THC的关键在于有效的THC萃取方法。由于串联质谱（MS/MS）可以消除干扰，从而可以提高血中THC及其代谢物检测的灵敏度和定量分析的可靠性。本应用报告介绍了采用高流量 Bond Elut Certify II SPE柱快速有效地萃取血中THC及其代谢物的方法。萃取物经过衍生化以提高其挥发性，衍生产物随后采用具备低热容（LTM）柱模块及反吹功能的Agilent 7890A三重串联四极杆GC/MS系统进行分析。然后再联接Agilent 7000B三重串联四极杆 GC/MS系统，多反应监测（MRM）模式下采用 MS/MS快速灵敏地检测THC及其代谢物11-OH-THC（11-羟基-Δ9-四氢大麻酚）和THCA（11-正-Δ9-四氢大麻

Agilent Technologies

酚-9-羧酸）。反吹功能可以提高系统的耐用性和分析速度，一次分析只需6 min的运行时间和8 min的循环时间。采用三重串联四极杆GC/MS系统的 MRM MS/MS 分析，得到了优良的结果，动态线性范围 0.1- 50 ng/mL。

实验部分

标准品和试剂

作为内标物使用的三氘代THC、11-OH-THC 和THCA（100 µg/mL 甲醇溶液），以及未标记THC、11-OH-THC和THCA（100 µg/mL 甲醇溶液）来自Cerilliant 公司（Round Rock, TX）。方法中内标溶液的浓度均为10 µg/mL。

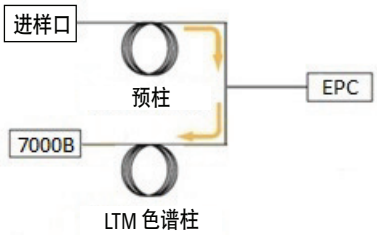
甲醇、乙腈、甲苯、乙酸乙酯、正己烷、冰醋酸和二氯甲烷来自Sigma Aldrich 公司（St. Louis, MO）。所有溶剂为高效液相色谱（HPLC）级或更高纯度，所有化学品为ACS级。实验中使用安捷伦高流量Bond Elut Certify II固相萃取柱。衍生试剂BSTFA（N, O-双（三甲硅基）三氟乙酰胺）和 TMCS（三甲基氯硅烷）购自Cerilliant公司。带有稳定剂草酸钾和氟化钠的普通人全血来自Bioreclamation 公司（Hicksville, NY），用此空白基质制备标准品溶液，绘制校正曲线。

仪器

实验在装备有多模式进样口（MMI）和LTM柱模块的Agilent 7890N 气相色谱仪上进行，联用7000B三重串联四极杆GC/MS。色谱分析采用一个用于反吹的预柱，以及通过一个吹扫Ultimate Union连接的低热容（LTM）色谱柱（图1）。仪器条件列于表1。

a.

进样到预柱上



b.

反吹预柱，以及THC及其代谢物在主色谱柱上的分离

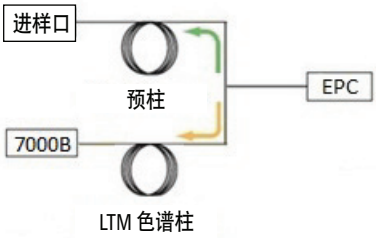


图1. 建立此方法所采用的反吹系统示意图。EPC: 电子气动控制模块；7000B: Agilent三重串联四极杆GC/MS 系统

表1. Agilent 7890N/7000B气相色谱和三重串联四极杆质谱条件

GC 运行条件	
预柱	从15 m × 0.25 mm, 0.25 µm HP-5 ms超高惰性柱（部件号19091S-431UI）上截取1 m
分析柱	15 m × 0.25 mm, 0.25 µm DB-17 ms LTM 柱模块（部件号122-4712LTM）
进样量	1 µL
进样口温度	恒温 280 °C
进样模式	0.5 min 脉冲不分流，35 psi
柱温箱温度	GC 柱温箱: 280 °C保持6 min（恒温）
LTM 模块:	100 °C保持50 s 以200 °C/min的速度从100 °C升到230 °C 以10 °C/min的速度从230 °C升到280 °C 280 °C保持1 min
载气	氦气，恒压模式 预柱：1 psi；柱1：5 psi；柱2：9.6 psi
传输线温度	300 °C
MS 条件	
调谐模式	自动调谐
增益	20
采集参数	EI 模式；多反应监测（MRM）
碰撞气	氮气，恒流，1.5 mL/min
冷却气	氦气，恒流，2.25 mL/min
溶剂延迟	3.0 min
MS温度	离子源 230 °C；四极杆150 °C

样品制备

将包含10 µg/mL 各内标（ISTD），并添加THC、11-OH-THC和THCA的2 mL血样移取到样品管中，加入4 mL乙腈混匀。以2500 rpm的转速离心5 min后，取上清液在35-40 °C下氮气吹至约3 mL，加入0.1 M醋酸钠溶液（pH 6.0）7 mL。

高流量Bond Elut Certify II SPE柱依次用2 mL甲醇、2 mL 0.1 M醋酸钠缓冲液（pH 6.0，含5%甲醇）冲洗。上样前保持柱填料湿润。以1- 2 mL/min的速度缓慢上样。然后用2 mL pH 6.0的醋酸钠缓冲液冲柱，在保持最大真空度的情况下干燥5 min，然后用1 mL正己烷冲洗。在中性条件下，采用2 mL正己烷-乙酸乙酯（95:5）混合液洗脱THC。然后柱子用5 mL甲醇-去离子水（1:1）冲洗。再次在最大真空度下干燥柱子约5 min，并用1 mL正己烷冲洗。用2 mL含1%醋酸的正己烷-乙酸乙酯（75:25）溶液洗脱11-OH-THC和THCA。将洗脱下来的THC及其代谢物合并，衍生前干燥。

洗脱液在温度不超过40 °C的条件下氮气吹干，残留物用60 µL甲苯复溶，然后加入含1%TMCS 的40 µL BSTFA进行衍生。样品管加盖密封，70 °C下加热20 min，然后进样至串联四极杆GC/MS系统分析。

分析参数

所设置安捷伦三重串联四极杆 GC/MS 系统参数列于表 2。

表2. Agilent 7000B 三重串联四极杆 GC/MS 系统分析参数

化合物	RT (min)	MRM	驻留时间 (ms)	碰撞能量 (EV)
THC (Δ9-四氢大麻酚)	3.5	386→303* 386→330 386→289	25 27 30	20 10 25
THC-d3	3.5	389→306* 389→330 389→292	10 11 15	20 10 25
11-OH-THC (11-羟基-Δ9-四氢大麻酚)	4.5	371→289* 371→305 371→265	24 26 27	20 15 15
11-OH-THC-d3	4.5	374→292* 374→308 374→268	10 12 12	20 15 15
THCA (11-正-Δ9- 四氢大麻酚-9-羧酸)	5.6	371→289* 488→297 488→371	23 44 29	15 20 20
THCA-d9	5.5	380→292* 497→306 497→380	15 30 22	15 20 20

*定量离子。所有其它离子对为定性离子

结果

采用高流量Bond Elut Certify II小柱对样品进行SPE处理

筛选生物体液样品中的滥用药物需要有耐用的、具有高的纯化效率和高回收率的分析方法。Bond Elut Certify固相萃取柱正是专为快速高效地从尿液及其它生物基质中提取非极性阴离子化合物而开发的[1]。混合型（非极性C8及强阴离子交换剂）吸附剂同时具有非极性、极性和离子交换性质，这种特性优势保证了用它萃取多种类型药物时具有快速、简单、重现性好和净化能力强的特点。这些小柱可以快速高效地从全血中萃取THC、11-OH-THC 和THCA，且具有高回收率。

反吹

反吹可以使所建立的分析方法非常耐用并且运行周期短，它可以防止高沸点化合物在色谱柱中积聚，从而减少了组分保留时间的漂移、峰形扭曲和化学噪声，提高了定量准确性。反吹也减少了MS源的污染及仪器的日常全面清洗工作，同时运行时间得以缩短。这最终使分析方法的耐用性增强，具有优良的动态线性范围，运行时间仅需6 min（不包括样品制备时间），循环周期仅需8 min。

为保持色谱分离度，安捷伦微板流路控制技术组件能够以最小的死体积实现简便快速的反吹操作。在进样阶段，进样口动力控制模块（PCM）在足够长的时间里保持较高的压力，确保分析物从预柱转移到分析柱中（图1a）。反吹时，进样口压力降到1 psi，迫使气流反向通过预柱并从分流口放空（图1b）。THC、11-OH-THC 和THCA 就以这种方式进入分析柱进一步分离，而高沸点化合物被反吹并通过分流口被清除。

低热容模块

本方法还于GC柱温箱外使用了一个低热容（LTM）柱模块，它可单独优化控制分析柱柱温（图1）。这些组件的独特设计可以实现色谱柱非常快速的升温和冷却。LTM柱模块可以方便地加在安捷伦GC上，而无需对进样器、自动进样器或检测器做任何改动。

动态线性范围

本方法THC和11-OH-THC的动态线性范围是0.1-50 ng/mL，THCA的是1-100 ng/mL（图2），符合行业规范要求。定量准确度高，三种分析物的R^2均为 0.999。

MRM 结果

使用MassHunter法医报告模板，THC及其两个代谢物的样品定量分析报告可以方便快捷地输出，报告附有包括内标在内的总离子流（TIC）色谱图和所有转换离子的谱图（图3-5）。请注意图中并没有干扰物的转换离子峰，甚至在每种分析物动态线性范围的浓度最低端也没有。

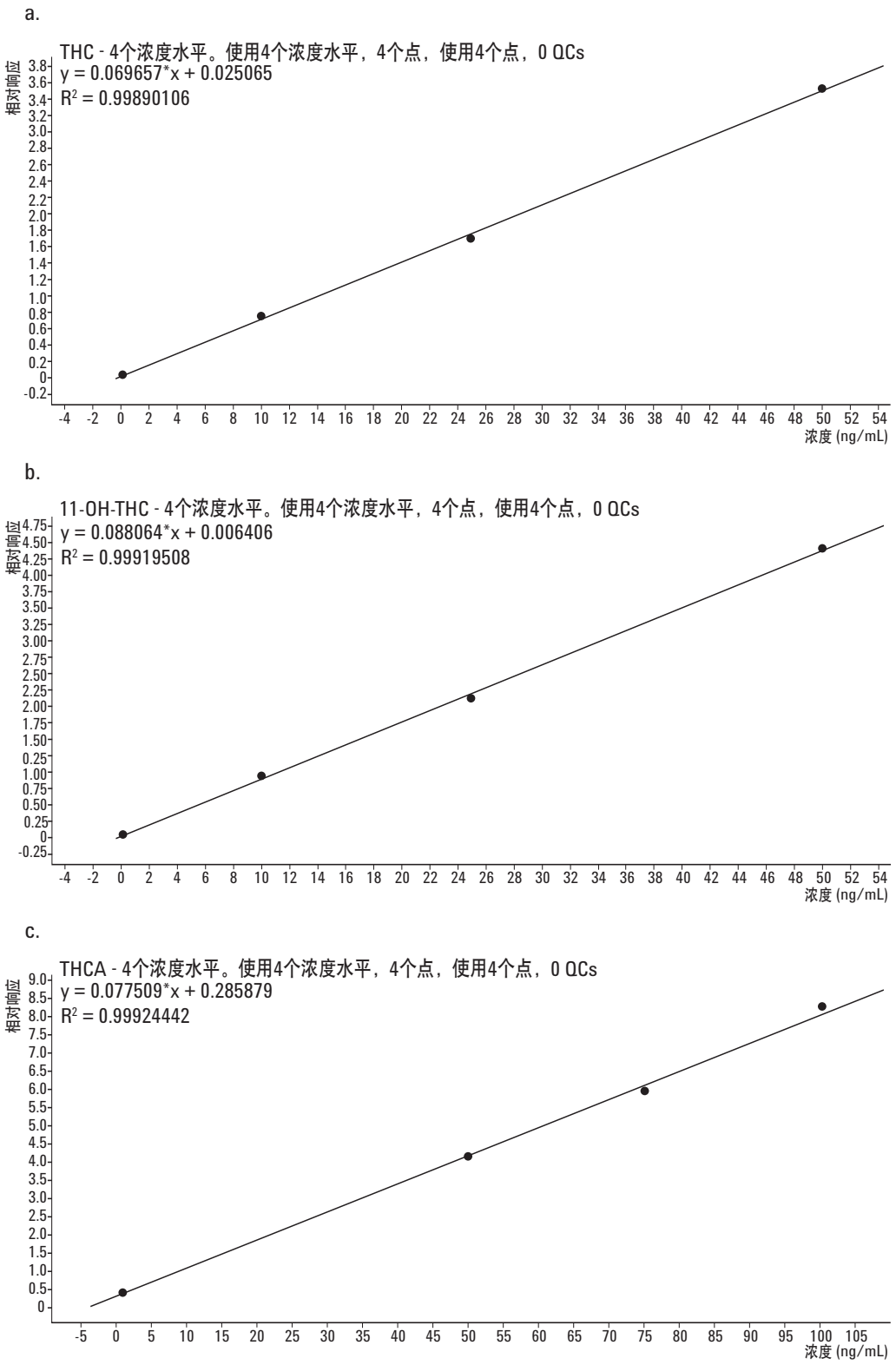
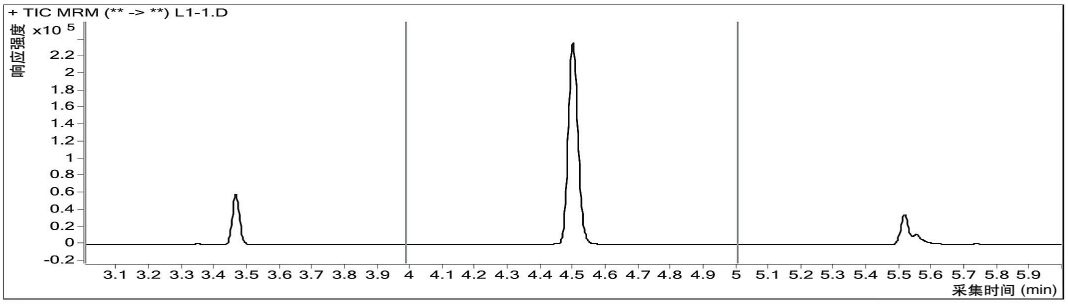


图2. 血液中THC (a)、11-OH-THC (b) 和THCA (c) 的校正曲线。THC和11-OH-THC采用 0.1、10、25和 50 ng/mL浓度点，THCA采用1、50、75和 100 ng/mL浓度点

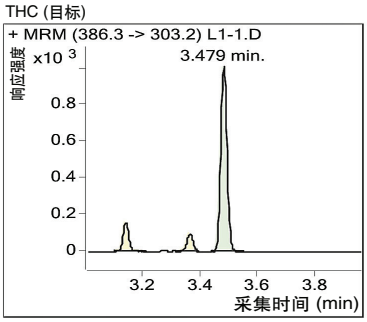
样品定量分析报告

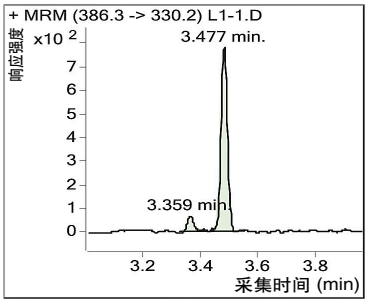
数据文件	:	L1-1.D
操作者	:	DATASYSTEM01/Admin
采集方法名称	:	LTM.THC.OMRM.7000.elex.m
采集时间	:	2011-04-28 18:19
样品名称及保存路径	:	L1-1, D:/MassHunter/GCMS/1/data/04-28-2011-redo/
样品瓶	:	3
稀释倍数	:	0.0
样品信息	:	
最后校正更新	:	2011-05-05 13:57

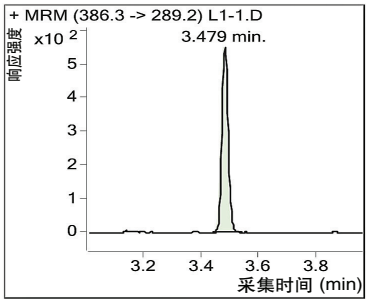
化合物	信号	保留时间	限度范围	响应值	含量	限度范围	终浓度
D3-THC	389.3 -> 306.2	3.46		37956			
	389.3 -> 330.2			32853	86.6	64.3-104.3	
	389.3 -> 292.2			18032	47.5	22.8-62.8	
THC	386.3 -> 303.2	3.48	3.29 - 3.64	1554			0.100
	386.3 -> 330.2			1237	79.7	62.4-102.4	
	386.3 -> 289.2			848	54.6	23.6-63.6	



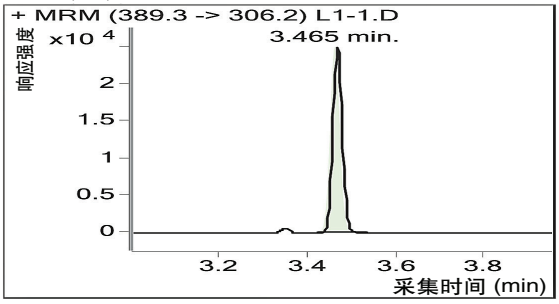
THC (目标)







D3-THC (内标)



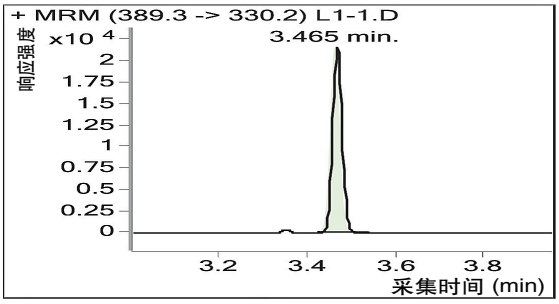
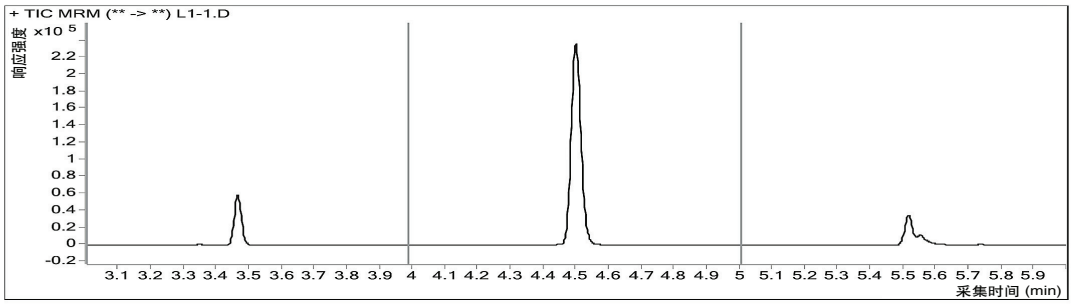


图3. 含0.1 ng/mL THC血液样品定量分析报告。RMS的信噪比为175:1，噪音区间 3.6 - 3.9 min

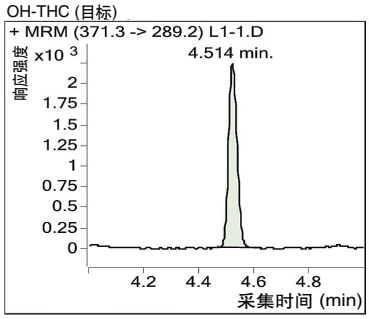
样品定量分析报告

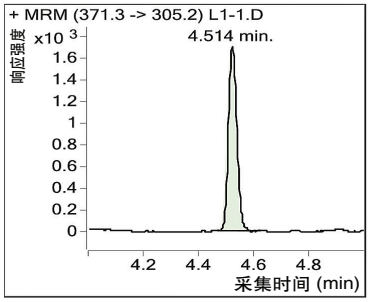
数据文件	:	L1-1.D
操作者	:	DATASYSTEM01\Admin
采集方法名称	:	LTM.THC.OMRM.7000.eiex.m
采集时间	:	2011-04-28 18:19
样品名称及保存路径	:	L1-1, D:\MassHunter\GCMS\1\data\04-28-2011-redo\
样品瓶	:	3
稀释倍数	:	0.0
样品信息	:	
最后校正更新	:	2011-05-05 13:57

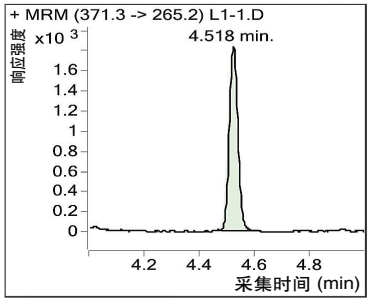
化合物	信号	保留时间	限度范围	响应值	含量	限度范围	终浓度
d3-OH-THC	374.3 -> 292.2	4.5		175705			
	374.3 -> 308.2			157882	89.9	68.8-108.8	
	374.3 -> 268.3			148545	84.5	59.4-99.4	
OH-THC	371.3 -> 289.2	4.51	4.27 - 4.72	4924			0.099
	371.3 -> 305.2			3707	75.3	67.4-107.4	
	371.3 -> 265.2			4050	82.3	58.2-98.2	



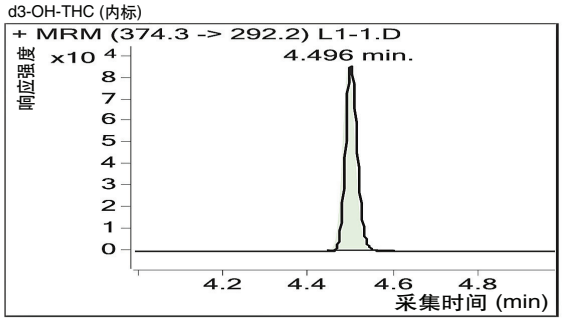
OH-THC (目标)

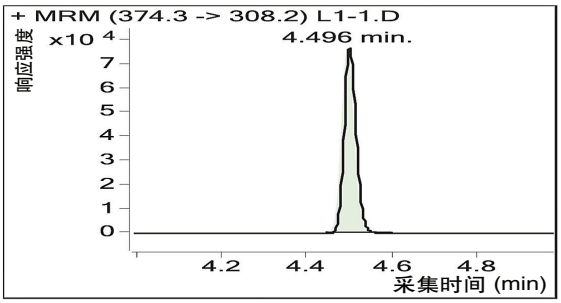






d3-OH-THC (内标)





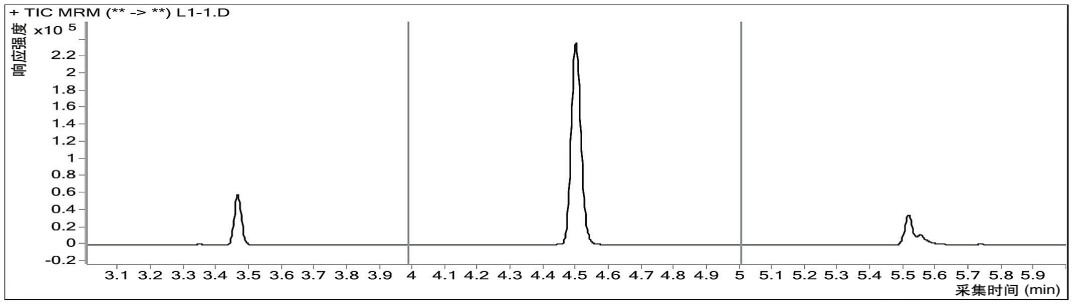
DrugQuantReport_Version4-2Qualifiers.xlsx Page 5 of 15 Printed at: 2:00 PM on: 5/5/2011

图4. 含0.1 ng/mL 11-OH-THC血液的样品定量分析报告。RMS信噪比为46:1，噪音区间4.6 -4.9 min

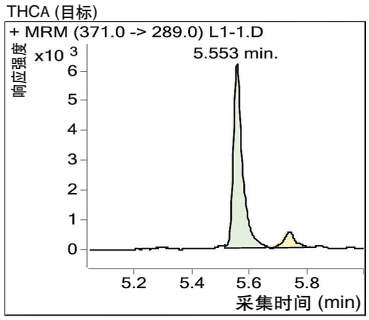
样品定量分析报告

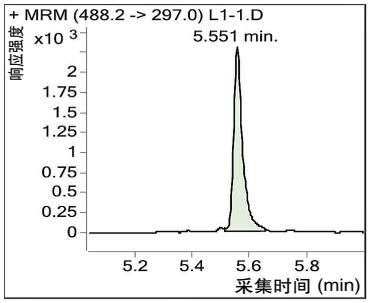
数据文件	:	L1-1.D
操作者	:	DATASYSTEM01\Admin
采集方法名称	:	LTM.THC.OMRM.7000.eiex.m
采集时间	:	2011-04-28 18:19
样品名称及保存路径	:	L1-1, D:\MassHunter\GCMS\1\data\04-28-2011-redo\
样品瓶	:	3
稀释倍数	:	0.0
样品信息	:	
最后校正更新	:	2011-05-05 13:57

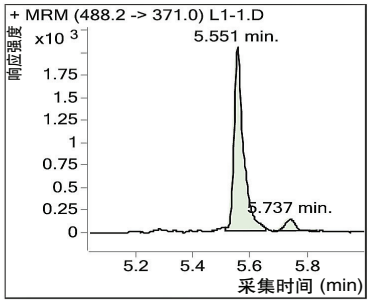
化合物	信号	保留时间	限度范围	响应值	含量	限度范围	终浓度
d9-THCA	380.0 -> 292.2	5.51		38358			
	497.0 -> 306.1			9800	25.5	5.6-45.6	
	497.0 -> 380.1			11765	30.7	12.5-52.5	
THCA	371.0 -> 289.0	5.55	5.26 - 5.82	13985			1.015
	488.2 -> 297.0			5124	36.6	9.1-49.1	
	488.2 -> 371.0			4758	34	14.4-54.4	



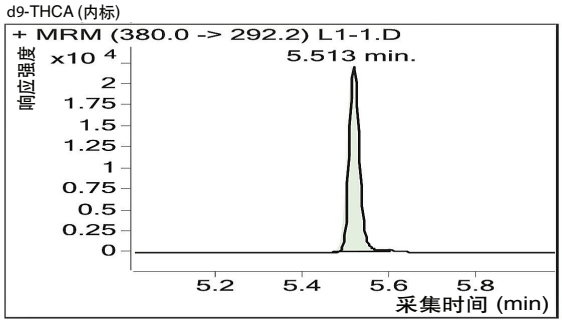
THCA (目标)







d9-THCA (内标)



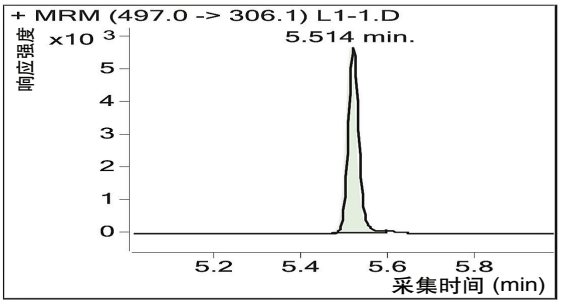


图5. 含1 ng/mL THCA血液样品的定量分析报告。RMS信噪比为39:1，噪音区间5.1-5.3 min

结论

带有LTM的Agilent 7890N 气相色谱系统与Agilent 7000B三重串联四极杆GC/MS系统联用，建立了快速耐用的分析血中THC及其代谢物的方法。采用高流量Bond Elut Certify II SPE柱、GC柱反吹技术及MRM检测，可有效消除所有干扰，THC和11-OH-THC的定量动态线性范围是0.1-50 ng/mL，THCA的是1-100 ng/mL。LTM组件和反吹技术可以实现快速分析，分析运行时间6 min，实验循环周期8 min。

参考文献

1. R.M Sears, Solid Phase Extraction of THD, THC-COOH and 11-OH-THC from Whole Blood, Agilent Technologies Application Note 00315.

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、描述及技术规格等如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

中国印刷
2011年7月5日
5990-8456CHCN

Agilent Technologies

使用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 通过聚合物 SPE 阳离子交换萃取尿液中的苯二氮卓类药物

应用简报

法医毒理学

作者

William Hudson
安捷伦科技公司

前言

苯二氮卓代表一大类药物，包括地西泮 (Valium)、甲氨二氮䓬 (Librium)、奥沙西泮 (Serax)、劳拉西泮 (Ativan)、阿普唑仑 (Xanax)、氯硝西泮 (Clonopin) 等化合物。1,4-苯二氮卓类（如地西泮、去甲西泮和替马西泮）被代谢并分解为奥沙西泮和奥沙西泮葡糖苷酸。硝基苯二氮卓类（如氯硝西泮和氟硝西泮）被代谢为尿液中的 7-氨基代谢物。氟西泮快速发生去烷基化。

由于基质组分含量较高，因此难以利用 LC/MS 对苯二氮卓类进行定量分析。有机盐以及色素和蛋白质会导致离子抑制和信号强度损失。Agilent Bond Elut Plexa PCX SPE 产品是聚合物阳离子交换剂型 Plexa 系列产品的一员。Plexa PCX 产品利用通用的简化方法去除基质中的中性及酸性干扰物并浓缩碱性分析物，从而提高碱性化合物定量分析的分析性能和灵敏度。

此外，Bond Elut Plexa PCX SPE 产品提供了更快速而重现的流速，使不同样品管和样品孔之间具有良好的一致性。Bond Elut Plexa PCX SPE 产品的高极性羟基化表面完全不含酰胺，从而显著降低了离子抑制效应。因此，颗粒外表面最大程度减小了与蛋白质和磷脂的强结合。本文介绍了一种利用 Bond Elut Plexa PCX SPE 管定量测定人尿液中苯二氮卓类药物及其目标代谢物的 LC/MS/MS 方法。还需要将 5000 单位 β-葡萄糖醛酸酶加入含 1 M 乙酸 (pH = 3.8) 缓冲液的尿液样品中，对样品进行水解。在萃取之前，将样品涡旋混合并置于 60 °C 下温育 2 小时。

Agilent Technologies

材料与方法

表 1. SPE 试剂和溶液

2% 甲酸	将 2 mL 浓甲酸加入 100 mL 去离子水中
甲醇	试剂级或更高级别
50% 甲醇	将 50 mL 甲醇加入 50 mL 去离子水中
5% 氨的甲醇溶液	将 5 mL 浓氨水加入 100 mL 甲醇中

表 2. SPE 方法

色谱柱：	Agilent Bond Elut Plexa PCX 30 mg 3 mL 管（部件号 12108303）
样品预处理：	1 mL 人尿液。用 2% 甲酸稀释 2 倍
活化：	1. 1 mL CH_3OH
	2. 1 mL H_2O
上样：	在低真空或非真空条件下上样并萃取
冲洗 1：	2 mL 2% 甲酸
冲洗 2：	2 mL 50% CH_3OH 水溶液
洗脱：	1 mL 5% NH_3 的甲醇溶液

将所有样品蒸干，然后复溶于 200 µL 50:50 0.1% 甲酸水溶液:CH_3OH 中。

表 3. 质谱条件

化合物	Q1	Q3	CE
氯硝西泮	316.0	270.0	16.5 V
7-氨基氯硝西泮	285.8	121.0	24.5 V
氟拉西泮	388.0	315.0	18.0 V
去烷基氟拉西泮	288.9	140.0	24.0 V
咪达唑仑	326.4	290.9	21.5 V
阿普唑仑	309.0	204.9	37.0 V
氟硝西泮	314.0	268.0	21.0 V
7-氨基氟硝西泮	284.1	135.0	22.0 V
甲氨二氮䓬	300.3	227.0	19.5 V
地西泮	285.0	222.0	20.5 V
劳拉西泮	321.0	274.9	18.0 V
奥沙西泮	286.8	241.0	16.5 V
去甲西泮	271.0	165.0	23.0 V
替马西泮	301.0	255.0	17.0 V

液相色谱条件

流动相：	A：0.1% 甲酸	
	B：甲醇	
梯度：	t = 0-1 min	40% A:60% B
	t = 2.0-4.30 min	20% A:80% B
	t = 4.31-5.30 min	40% A:60% B
流速：	0.2 mL/min	
色谱柱：	Agilent Pursuit XRs$^{Ultra\ 2.8}$ C18, 2.0 × 100 mm（部件号 A7511100X020）	
毛细管电压：	70 V	
干燥气温度：	350 °C，30 psi	
CID：	氩气	
极性：	负	

结果与讨论

该流程介绍了人尿液中 14 种不同苯二氮卓类药物的萃取与测定方法。固相萃取与 LC/MS/MS 分析相结合得到的检测限 (LOD) 为 1.0 ng/mL。基于 n = 6 取样得到的 RSD 值，通过一阶回归计算得到回收率。结果达到了优异的绝对回收率，表明实验中的保留和洗脱效果良好，且离子抑制效应极低。所有评估化合物响应的线性范围涵盖三个数量级（1.0 ng/mL 至 1.0 µg/mL），相关系数均高于 0.995。为证实重现性，对两种浓度的样品进行分析 (n = 6)。表 4 显示该萃取方法获得了重现性非常高的回收率。

表 4. 分析物相对回收率

分析物	%回收率 (1 ng/mL)	%RSD	%回收率 (100 ng/mL)	%RSD
氯硝西泮	116	13	103	7
7-氨基氯硝西泮	102	10	99	2
氟拉西泮	117	14	106	8
去烷基氟拉西泮	115	13	99	6
咪达唑仑	108	13	110	4
去甲西泮	113	15	107	7
阿普唑仑	113	17	110	8
氟硝西泮	107	16	101	3
7-氨基氟硝西泮	112	18	95	9
甲氨二氮䓬	119	15	92	10
地西泮	111	12	99	8
替马西泮	118	4	97	8
劳拉西泮	102	14	94	10
奥沙西泮	113	10	97	5

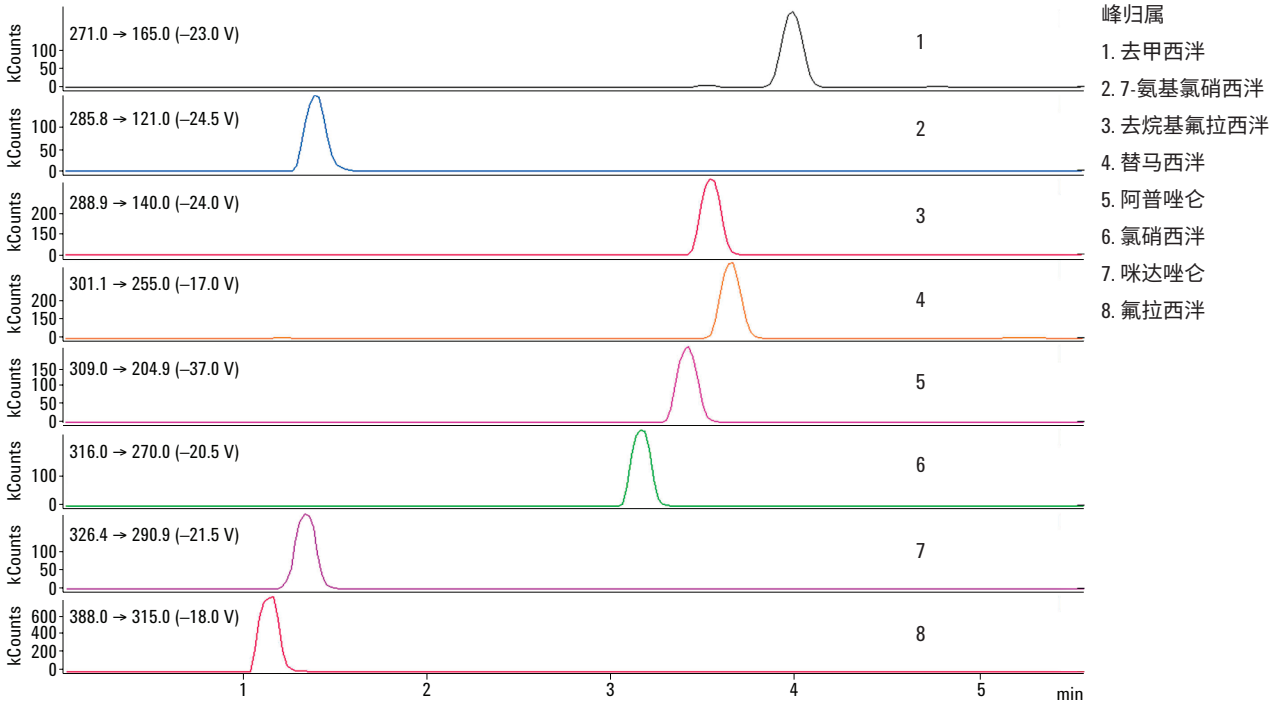


图 1a. 100 ng/mL 尿液萃取物的色谱图（峰 1-8）

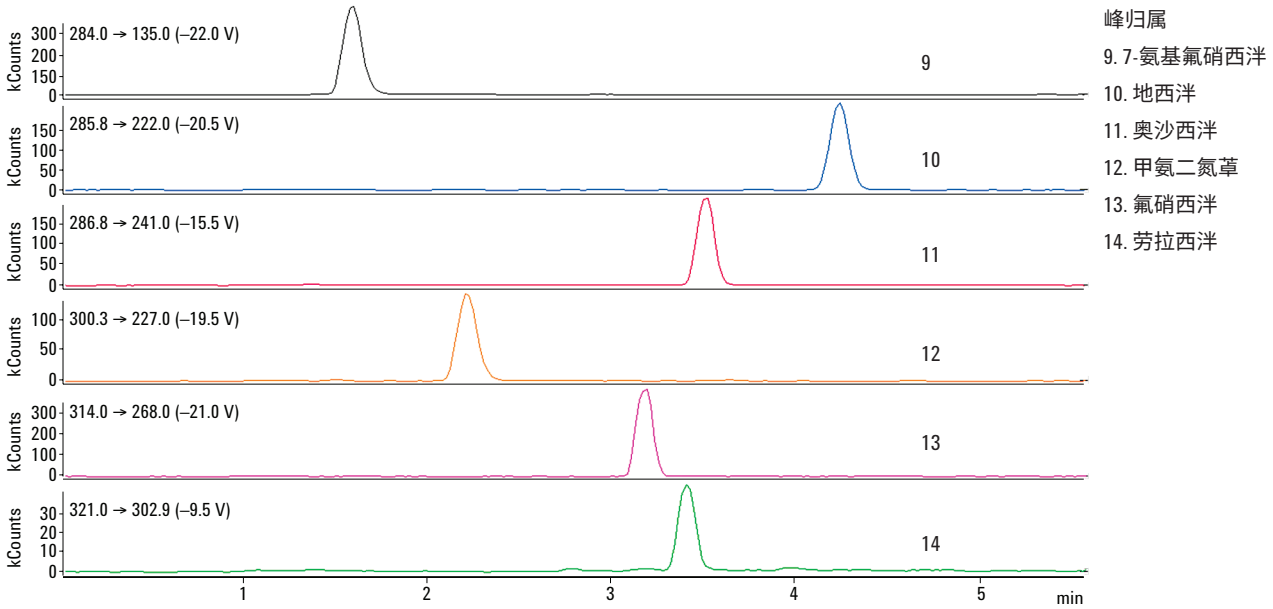


图 1b. 100 ng/mL 尿液萃取物的色谱图（峰 9-14）

结论

Agilent Bond Elut Plexa PCX 是高通量 SPE 应用的实用工具，高通量 SPE 应用要求分析含量较低的分析物，需要有优异的重现性，还必须以最少的方法开发快速实施。Bond Elut Plexa PCX 产品可满足这些要求。

借助 Bond Elut Plexa PCX，开发出一种通用的药物萃取方法，适用于萃取具有碱性氨基官能团的极性分析物。在酸性条件下，带电荷的分析物结合到吸附剂的阳离子交换基团上。用酸性水溶液冲洗去除极性干扰物质和蛋白质。可以用 50% 甲醇水溶液进行冲洗，分析物无显著损失。该冲洗过程可洗脱保留在吸附剂疏水核处的中性化合物。最后，利用氨化甲醇破坏阳离子交换的相互作用，使苯二氮卓类药物被洗脱。

由于 Bond Elut Plexa PCX 填料粒径分布范围更窄且没有导致堵塞的细颗粒，样品管之间具有优异的重现性，因此流速很快。因此，Bond Elut Plexa PCX 管是高通量 SPE 应用的实用工具，高通量 SPE 应用要求分析含量较低的分析物，需要有优异的重现性，还必须以最少的方法开发快速实施。

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：
800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

司法鉴定专用。

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（中国）有限公司，2014
2014 年 8 月 29 日，中国出版
SI-01334

Agilent Technologies

使用聚合物固相萃取法萃取血浆中的碱性药物

应用简报

制药

作者

William Hudson、David Jones、
Arnie Aistars 和 Max Erwine
安捷伦科技公司
5301 Stevens Creek Boulevard
Santa Clara, CA 95051
USA

前言

近年来，生物分析固相萃取 (SPE) 一直以聚合物吸附剂为主。相对二氧化硅型吸附剂而言，聚合物吸附剂简便易用、流动性好且能够耐受干燥的影响，因此成为需要快速验证和尽量减少方法开发的高容量、高通量测定的理想选择。

由于方法验证过程耗时且需要高质量数据，因此研究人员迫切需要快速且能提供出色回收率和高重现性的 SPE 方法。SPE 流程的精简是在不影响数据完整性的情况下，简化方法验证过程和缩短验证时间。Bond Elut Plexa 通过简单有效的方法最大程度减少了方法开发，并采用先进的聚合物结构（最大程度减少了生物大分子与表面的结合）提高了灵敏度与重现性，最终简化并优化了 SPE 流程。

Agilent Technologies

材料与方法

SPE 试剂和溶液

2% 氨水	将 20 µL 浓氨水加入 1 mL 去离子水中
甲醇	试剂级或更高级别
5% 甲醇	将 5 mL 甲醇加入 95 mL 去离子水中
Bond Elut Plexa	10 mg 96 孔板（部件号 A4969010）

SPE 方法

样品	100 µL 人血浆
预处理	用 300 µL 2% NH_4OH 进行稀释
条件	1. 500 µL CH_3OH 2. 500 µL H_2O
冲洗	500 µL 5% CH_3OH 水溶液
洗脱	500 µL CH_3OH

将所有样品蒸干，然后复溶于 100 µL 80:20 0.1% 甲酸:CH_3OH 水溶液中。

LC/MS 采用 ESI，干燥气 400 °C，30 psi

液相色谱条件

流动相

A	0.1% 甲酸
B	甲醇

液相色谱梯度程序

时间 (min)	%B
0:00	40
0:15	40
1:00	80
3:00	80
4:30	40

色谱柱

类型	Pursuit XRs C18 3 µm, 50 × 2.0 mm（部件号 A3001050X020）
流速	0.2 mL/min

结果与讨论

本文所述的流程提供了一种萃取人血浆中碱性或中性药物的简单有效的 SPE 方法。SPE 和 LC/MS/MS 分析相结合得到的定量限 (LOQ) 为 1.0 ng/mL。该应用的内标为 50 ng/mL 喹硫平。

基于 n = 6 的进样得到的 RSD 值，通过二阶回归计算得到回收率。结果达到了优异的回收率，表明实验中的保留和洗脱效果良好，且离子抑制效应极低。所有评估化合物响应的线性范围涵盖三个数量级（1.0 ng/mL 至 1.0 µg/mL），相关系数均高于 0.995 (n = 6)。为证实重现性，对两种浓度的样品进行分析 (n = 6)。图 1 显示了 100 ng/mL 萃取物的色谱图。如表 1 所示，萃取获得了可重现的高回收率。

结论

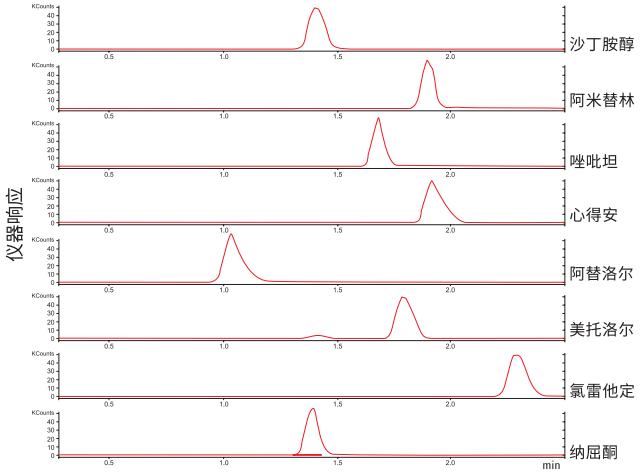


图 1. 100 ng/mL 人血浆萃取物的色谱图

表 1. 碱性药物利用 Bond Elut Plexa 获得的高回收率

药物	log P	pKa	0.5 µg/mL %回收率	%RSD	1.0 µg/mL %回收率	%RSD
沙丁胺醇	1.3	10.3	95	5	100	2
阿米替林	4.6	9.4	100	10	100	4
唑吡坦	3.9	6.2	100	8	103	2
心得安	3.6	9.5	102	6	101	6
阿替洛尔	1.3	9.6	97	4	101	4
美托洛尔	1.3	10.8	100	5	100	5
氯雷他定	5.2	4.9	97	5	95	3
纳屈酮	1.8	9.2	103	11	100	4

Bond Elut Plexa 是高通量 SPE 应用的实用工具，高通量 SPE 应用需要分析含量较低的分析物，需要经验证的重现性，还需要在仅有极少方法开发的情况下快速实施。一种用于碱性分析物的分析方法涵盖了各种分析物极性，并提供了可重现的高回收率。因此，强烈推荐将 Bond Elut Plexa 用于药物临床试验的生物分析工作（包括合同研究）中。

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司
2011 年 3 月 21 日，中国出版
5990-7685CHCN

Agilent Technologies

使用 Bond Elut Plexa 聚合物阳离子交换固相萃取柱萃取血浆中的极性碱性药物

应用简报

生物制药

作者

William Hudson 和
Andrea Junker-Buchheit
安捷伦科技公司

前言

阳离子交换吸附剂非常适合用于碱性药物。分析物在酸性溶液中易于荷电，并容易与吸附剂的离子交换官能团发生相互作用。由于极性碱性化合物具有较差的疏水作用和水溶性，因此反相吸附剂不适用。

Agilent Bond Elut Plexa PCX 是 Plexa 系列产品中的新成员，使用的是聚合物阳离子交换技术。Plexa PCX 利用通用的简化方法去除基质中的中性及酸性干扰物并浓缩碱性分析物，从而提高碱性化合物定量分析的分析性能和灵敏度。

此外，Plexa PCX 提供了更快速而重现的流速，使不同样品管和样品孔之间具有良好的一致性。Plexa PCX 的高极性羟基化表面完全不含酰胺，因此显著降低了离子抑制。颗粒外表面最大程度减小了与蛋白质和磷脂的强结合，可确保高效除去血浆中的磷脂。本研究开发出一种萃取人血浆中极性碱性药物的简单通用方法。

Agilent Technologies

材料与方法

表 1. SPE 试剂和溶液

2% 磷酸	将 20 µL 浓 H_3PO_4 加入 1 mL 去离子水中
甲醇	试剂级或更高级别
2% 甲酸	将 20 µL 浓甲酸加入 1 mL 去离子水中
甲醇:乙腈 (1:1, v/v)	将 1 mL 甲醇加入 1 mL 乙腈中
5% NH_3 甲醇:乙腈 (1:1, v/v)	将 50 µL 浓氨水 加入 1 mL 甲醇:乙腈 (1:1, v/v) 中
Bond Elut Plexa 10 mg 96 孔板 (部件号 A4968010)	

表 2. SPE 方法

样品预处理	100 µL 人血浆。用 2% H_3PO_4 稀释 3 倍
条件	1. 500 µL CH_3OH 2. 500 µL 去离子 H_2O
上样	含药物混合物的样品流速为 1 mL/min
冲洗 1	500 µL 2% 甲酸
冲洗 2	500 µL 乙腈:甲醇 (1:1, v/v)
洗脱	500 µL 5% NH_3 甲醇:乙腈

将所有样品蒸干，然后复溶于 100 µL 80:20 0.1% 甲酸水溶液:CH_3OH 中。

结果与讨论

液相色谱条件

流动相： A：0.1% 甲酸
B：甲醇

梯度：

t = 0 min	80% A:0% B
t = 0-2 min	20% A:80% B
t = 3.5-5 min	80% A:20% B

色谱柱： Agilent Pursuit C18 3 µm, 2.0 × 50 mm (部件号 A3051050X020)

质谱条件

离子对和碰撞能量为：

化合物	Q1	Q3	CE
沙丁胺醇	240.1	148.0	-23.5 V
拉莫三嗪	256.0	256.0	-5.0 V
阿替洛尔	267.0	145.0	-34.0 V
舒马曲坦	296.1	201.1	-14.0 V

毛细管电压 = 25 V，干燥气温度 = 400 °C，30 psi，CID = 氩气

极性： 正

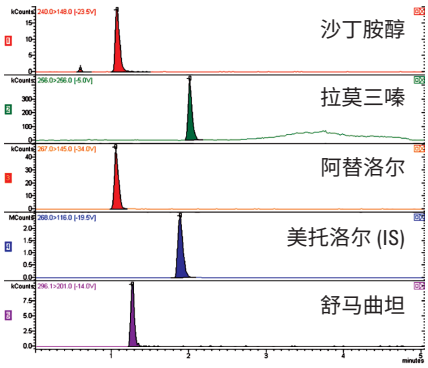


图 1. 50 ng/mL 萃取物的色谱图

该 LC/MS 方法介绍了使用 Bond Elut Plexa PCX 的 SPE 法定量测定人血浆中的极性碱性化合物（图 1）。固相萃取和 LC/MS/MS 分析的检测限 (LOD) 为 1.0 ng/mL。基于 n = 6 取样得到的 RSD 值，通过二阶回归计算得到回收率。

结果达到了优异的回收率，表明实验中的保留和洗脱效果良好，且离子抑制效应极低。所有评估化合物响应的线性范围涵盖三个数量级 (1.0 ng/mL 至 1.0 µg/mL)，相关系数均高于 0.999。为证实重现性，对两种不同浓度的样品进行分析 (n = 6)。如表 3 所示，按照通用的标准方案获得了可重现的高回收率。

表 3. 人血浆中的极性碱性化合物的回收率

分析物	log P	pKa	%回收率 (500 ng/mL)	%RSD[2]	%回收率 (1000 ng/mL)	%RSD[2]
舒马曲坦	0.96	9.6	95	5	97	4
阿替洛尔	1.30	9.6	94	3	91	2
沙丁胺醇	1.30	10.3	95	5	100	7
拉莫三嗪	1.50	5.7	92	3	97	4

[1] 根据萃取样品的信号强度与校准曲线信号强度的百分比计算得到回收率。[2] RSD = 标准偏差/平均回收率 × 100；n = 6

结论

借助 Agilent Bond Elut Plexa PCX，开发出一种通用的药物萃取方法，可用于萃取血浆中具有碱性氨基官能团的极性分析物。在酸性条件下，带电荷的分析物结合到吸附剂的阳离子交换基团上（见表 3 的 pKa）。用酸性水溶液冲洗去除极性干扰物质和蛋白质。可采用相对较强的溶剂（如 50% 甲醇:乙腈）进行中性冲洗，不会发生任何分析物损失。该冲洗过程可洗脱保留在吸附剂疏水核处的中性化合物。最后，利用有机溶剂与氨的混合物破坏阳离子交换的相互作用，使碱性药物被洗脱。

由于 Plexa PCX 填料粒径分布范围更窄且没有导致堵塞的细颗粒，样品管之间具有优异的重现性，因此所有 96 孔板的流速都很快。可轻松采用自动化 96 孔板技术，为最大程度提高效率带来新的机遇。因此，Bond Elut Plexa PCX 是高通量 SPE 应用的实用工具，高通量 SPE 应用要求分析含量较低的分析物，需要有经过验证的重现性，还必须以最少的方法开发快速实施。因此，强烈推荐将其用于药物临床试验的生物分析工作（包括合同研究）中。

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：
800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

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（中国）有限公司，2012
2012 年 9 月 6 日，中国出版
SI-01015

Agilent Technologies

使用 Bond Elut Plexa 聚合物阳离子交换固相萃取柱萃取血浆中的非极性碱性药物

应用简报

生物制药

作者

William Hudson 和
Andrea Junker-Buchheit
安捷伦科技公司

前言

用于药物分析的生物分析方法需要快速简单的方法开发和验证，以减少药物开发过程中的瓶颈。生物样品使分析变得复杂是因为其中存在蛋白质、多肽、盐类、磷脂及其他内源性化合物。必须通过样品净化除去这些干扰物，而同时又不能使目标分析物有过大的损失。固相萃取方法简单，适合常规分析，是首选的样品净化技术。

Agilent Bond Elut Plexa PCX 是 Plexa 系列产品中的新成员，使用的是聚合物阳离子交换技术。Plexa PCX 利用通用的简化方法去除基质中的中性及酸性干扰物并浓缩碱性分析物，从而提高碱性化合物定量分析的分析性能和灵敏度。此外，该产品能够提供更快速且高度重现的流速，使不同样品管和样品孔之间获得良好的一致性。Plexa PCX 的高极性羟基化表面完全不含酰胺，因此显著降低了离子抑制。颗粒外表面排阻蛋白质并可避免与磷脂发生强结合。因此，可确保高效除去血浆中的磷脂。本研究开发出一种人血浆中非极性碱性化合物的简单通用的萃取和分析方法。

Agilent Technologies

材料与方法

表 1. SPE 试剂和溶液

2% 磷酸	将 20 µL 浓 H_3PO_4 加入 1 mL 去离子水中
甲醇	试剂级或更高级别
2% 甲酸	将 20 µL 浓甲酸加入 1 mL 去离子水中
甲醇:乙腈 (1:1, v/v)	将 1 mL 甲醇加入 1 mL 乙腈中
5% NH_3 甲醇:乙腈 (1:1, v/v)	将 50 µL 浓氨水 加入 1 mL 甲醇:乙腈 (1:1, v/v) 中
Bond Elut Plexa 10 mg 96 孔板 (部件号 A4968010)	

表 2. SPE 方法

样品预处理	100 µL 人血浆。用 2% H_3PO_4 稀释 3 倍
条件	1. 500 µL CH_3OH 2. 500 µL 去离子 H_2O
上样	含药物混合物的样品流速为 1 mL/min
冲洗 1	500 µL 2% 甲酸
冲洗 2	500 µL 乙腈:甲醇 (1:1, v/v)
洗脱	500 µL 5% NH_3 甲醇:乙腈

将所有样品蒸干，然后复溶于 100 µL 80:20 0.1% 甲酸水溶液:CH_3OH 中。

结果与讨论

液相色谱条件

流动相： A：0.1% 甲酸
B：甲醇

梯度： t = 0 min 80% A:20% B
t = 0-2 min 20% A:80% B
t = 3.5-5 min 80% A:20% B

色谱柱： Agilent Pursuit C18, 2.0 × 50 mm, 3 µm（部件号 A3051050X020）

质谱条件

离子对和碰撞能量为：

化合物	Q1	Q3	CE
雷尼替丁	315.0	176.0	-21.0 V
心得安	260.1	116.0	-17.5 V
阿米替林	278.1	233.0	-17.0 V
氯雷他定	383.1	337.0	-31.0 V

毛细管电压 = 25 V，干燥气温度 = 400 °C，30 psi，CID = 氩气

极性： 正

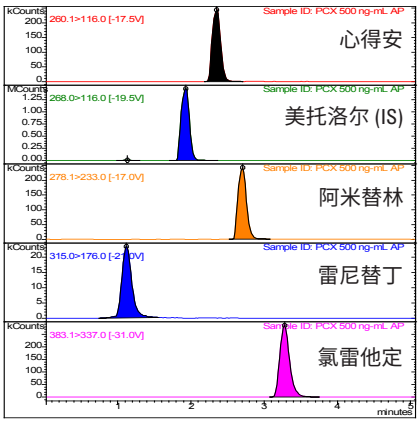


图 1. 50 ng/mL 萃取物的色谱图

该 LC/MS 方法介绍了使用 Bond Elut Plexa PCX 的 SPE 法定量测定人血浆中的非极性碱性化合物（图 1）。固相萃取和 LC/MS/MS 分析的检测限 (LOD) 为 1.0 ng/mL。基于 n = 6 取样得到的 RSD 值，通过二阶回归计算得到回收率。结果达到了优异的回收率，表明实验中的保留和洗脱效果良好，且离子抑制效应极低。所有评估化合物响应的线性范围涵盖三个数量级（1.0 ng/mL 至 1.0 µg/mL），相关系数均高于 0.999。

为证实重现性，对两种不同浓度的样品进行分析 (n = 6)。如表 3 所示，按照通用的标准方案获得了可重现的高回收率。

表 3. 人血浆中非极性碱性化合物的回收率

分析物	log P	pKa	%回收率 (500 ng/mL)	%RSD[2]	%回收率 (1000 ng/mL)	%RSD[2]
雷尼替丁	1.9	8.2	101	5	94	6
心得安	3.6	9.5	97	7	92	4
阿米替林	4.6	9.4	95	5	91	5
氯雷他定	5.2	9.3	100	4	91	4

[1] 根据萃取样品的信号强度与校准曲线信号强度的百分比计算得到回收率。
[2] RSD = 标准偏差/平均回收率 × 100；n = 6

结论

借助 Agilent Bond Elut Plexa PCX，可使用单一方法萃取血浆中的非极性碱性分析物，并提供可重现的高回收率。在酸性条件下，带电荷的分析物结合到吸附剂的阳离子交换基团上（见表 3 的 pKa）。用酸性水溶液冲洗去除极性干扰物质和蛋白质。可采用相对较强的溶剂（如 50% 甲醇:乙腈）进行中性冲洗，不会发生分析物损失。该冲洗过程可洗脱保留在吸附剂疏水核处的中性化合物。最后，利用有机溶剂与氨的混合物破坏阳离子交换的相互作用，使碱性药物被洗脱。

由于 Plexa PCX 填料具有更小的间隙路径且没有导致堵塞的细颗粒，样品孔之间具有优异的重现性，因此 96 孔板的流速很快。自动化 96 孔板技术非常便捷，为最大程度提高效率带来新的机遇。因此，Bond Elut Plexa PCX 是高通量 SPE 应用的实用工具，高通量 SPE 应用要求分析含量较低的分析物，需要有经过验证的重现性，还必须以最少的方法开发快速实施。强烈推荐将其用于药物临床试验的生物分析工作（包括合同研究）中。

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：
800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

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（中国）有限公司，2012
2012 年 9 月 6 日，中国出版
SI-01014

Agilent Technologies

固相萃取全血中的 THC、THC-COOH 和 11-OH-THC

应用简报

法医学与毒品检测

作者

Robert M. Sears, DFTCB

法医毒理学家

南卡罗来纳州执法部门

前言

大麻是应用范围仅次于酒精的滥用毒品，来源于大麻植物 (*Cannabis Sativa*)。大麻植物中含有 400 多种化学物质。Δ^9-四氢大麻酚 (THC) 是各种形式的 THC 中精神刺激性最强的一种。大麻常以卷烟形式出现，供使用者吸入大麻烟雾。THC 及其他形式的大麻类物质呈脂溶性，可快速进入身体组织。THC 被快速代谢为 11-羟基-Δ^9-四氢大麻酚 (11-OH-THC)，然后转化为 11-nor-Δ^9-THC-9-羧酸 (THC-COOH)。

检测尿液中的 THC 代谢物（主要为 THC-COOH）可反映出之前对 THC 的接触，但无法反映损害程度。检测血液中的 THC 及其代谢物可以更好地反映近期毒品使用情况，并且在损害测试时体现出优势。

本应用简报介绍了一种有效萃取人血液中 THC 及主要代谢物的 SPE 方法以及这些化合物的 GC/MS 分析。

仪器

气相色谱仪与单四极杆质谱仪联用系统

材料和试剂

高流速 Agilent Bond Elut Certify II SPE 小柱 200 mg（部件号 14113051）。Bond Elut Certify II 是 C8 与季铵型强阴离子交换键合二氧化硅的混合物。这两个固相填料官能团可有效保留 THC 化合物的极性和非极性官能团。

5% 苯基取代的低流失 GC/MS 色谱柱 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm

d3-THC、d3-11-0H-THC 和 d9-羧基-THC，购自 Cerilliant

样品前处理

用移液管将 2 mL 血液移入干净的试管中，其中含有 10-11 g/L (ng/mL) 内标

在涡旋混合的同时，逐滴加入 4 mL 低温乙腈

在至少 2500 rpm 的转速下将样品离心 5 分钟

将上清液转移至带标签的的试管中

在 35-40 °C 下用氮气将样品蒸发至 3 mL

向每个样品中加入 7 mL 0.1 M 乙酸钠缓冲液 (pH 6.0)

SPE 方法

活化

用 2 mL 甲醇对 Certify 小柱进行活化。（除非另外指明，所有步骤均采用约 2-5 in Hg 的低真空条件）。

然后用 2 mL 0.1 M 乙酸钠缓冲液（pH 6.0，含 5% 甲醇）对小柱进行活化。

在加入样品之前，使小柱保持湿润。

将样品倒入萃取柱储液槽中，并通过萃取柱缓缓抽吸样品 (1-2 mL/min)。

冲洗

2 mL 乙酸钠缓冲液，pH 6.0。

在最大真空度下干燥萃取柱约 5 分钟。

用 1 mL 己烷冲洗。

洗脱

用 2 mL 95:5 己烷:乙酸乙酯洗脱 THC。

用 5 mL 1:1 甲醇:去离子水冲洗色谱柱。

在最大真空度下干燥萃取柱约 5 分钟。

用 1 mL 己烷冲洗。

用 2 mL 含 1% 乙酸的 75:25 己烷:乙酸乙酯洗脱 THC-COOH 和 11-0H-THC（在单独的管中）。

为获得最好的结果，不要将馏分合并。应将其作为两个样品运行。在不超过 40 °C 的温度下用氮气蒸发洗脱的馏分。

衍生化

向样品中加入 500 µL 洗脱溶剂，并将其转移至干净的高回收率气相色谱样品瓶中。在不超过 40 °C 的温度下用氮气将样品蒸干。

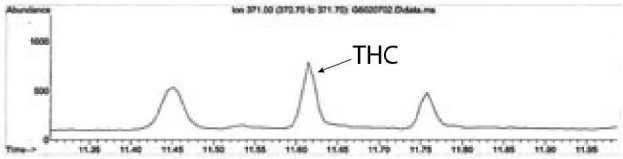
加入 35 µL 含 1% TMCS 的 BSTFA 以及 35 µL 乙酸乙酯。在样品上充入氮气，加盖，并在 70 °C 下加热 20 分钟。

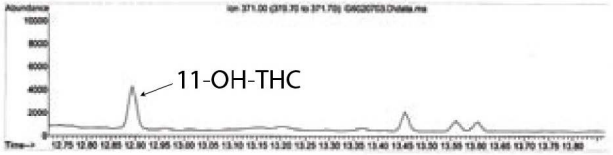
条件

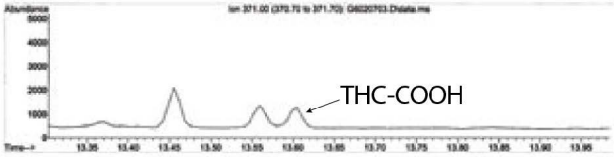
进样口温度：	250 °C
模式：	脉冲压力进样
进样量：	2 µL
初始柱温箱温度：	120 °C 保持 1 min 以 15 °C/min 升至 300 °C， 保持 0 min 以 30 °C/min 升至 310 °C， 保持 5.57 min

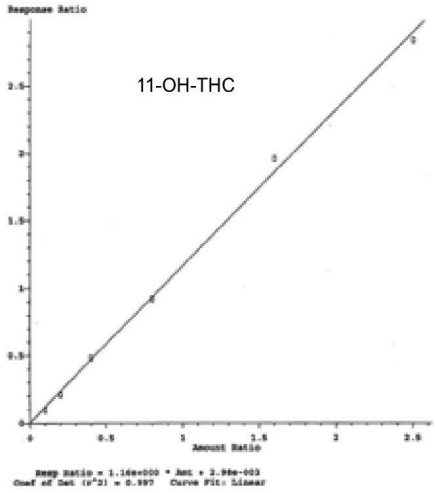
目标离子

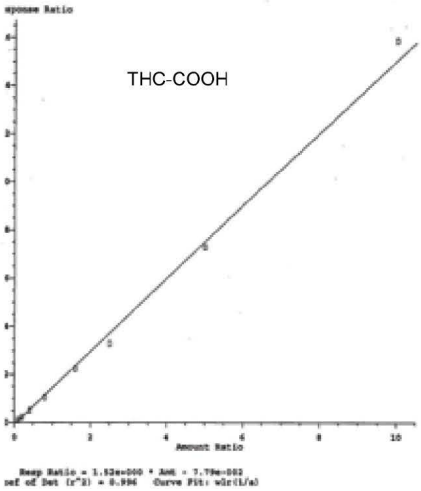
d3-THC	374，389，346（驻留时间 50 ms）
THC	371，386，343
线性范围	1-50 µg/L
d3-11-0H-THC	374，462，477
11-0H-THC	371，459，474
线性范围	1-50 µg/L
d9-THC-COOH	380，479，497
THC-COOH	371，473，488
线性范围	1-100 µg/L

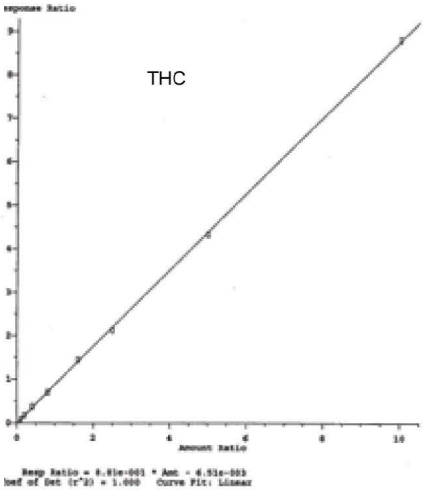












结论

上述数据表明可有效使用混合模式 SPE 与 GC/MS 检测对全血中低浓度的 THC 及主要代谢物进行萃取和定量分析。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

司法鉴定专用。
信息如有变更，恕不另行通知。
© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 10 月 6 日，中国出版
首次发表于 2010 年 5 月 11 日之前
A02465

The Measure of Confidence

Agilent Technologies

使用微量萃取样品前处理和 Poroshell 120 柱分析全血中的药物

应用简报

小分子药物与仿制药

作者

Joan Stevens
安捷伦科技公司

摘要

包括向少量血液中加入乙腈和盐的一种便捷分析方法用于测定全血中各种治疗类别药物。对混合物振摇和离心以进行萃取/分配，从而除去样品中的水和蛋白质。利用分散固相萃取 (SPE) 通过 SPE 吸附剂和盐对等量的有机相进行净化，以除去内源性基质组分。然后从加标样品中分离出分析物，平均回收率高于 80%，且多种物质的 RSD 通常低于 10%。这种针对全血的微量萃取方法可成功分离各种药物，检测限低于 10 ng/mL。该方法快速、简单、经济而有效。

Agilent Technologies

前言

生物基质中药物的测定通常用于 ADME (DMPK)、临床和法医学分析中。用于此类分析的主要技术包括免疫分析、液相色谱和气相色谱。色谱-质谱方法具有优异的灵活性、选择性、灵敏度、定性分析和定量分析能力，是许多应用的首选方法。生物样品中的药物分析需要采用各种样品前处理方法，从简单的蛋白质沉淀 (PPT) 到较复杂的固相萃取 (SPE)。需要一种经典的样品前处理方法来测定生物样品中的多类药物。通过疏水和/或离子交换作用分离酸性、中性和碱性药物的聚合物或混合模式 SPE 吸附剂可满足这一需求，然而，总要有提供快速且廉价的样品前处理技术的空间。

此前报道的方法实现了对食品中多残留农药的分析。这种方法被称为 QuEChERS（快速、简便、经济、高效、耐用且安全的样品前处理方法）[1]。作者报告称，各类农药均获得了优异的回收率。自该方法推出以来，已有许多报道文章采用 QuEChERS 分析各种化合物，其中包括但不限于抗生素 [2]、毒素 [3]、污染物 [4] 和药物 [5]。

本应用简报中介绍了 Plössl 等人 [5] 利用改良的微量萃取流程与 LC/MS/MS 分析测定全血中药物的扩展研究。本应用简报中介绍的实验使用了含 EDTA 或柠檬酸盐的人全血样品，并用 QuEChERS 方法（即非缓冲液的 AOAC 2007.01 和 EN 15662）对所用的非缓冲及缓冲萃取盐进行评估。另外还评估了第一个步骤（萃取/分配）中所用的改良乙腈（萃取溶剂）。使用具有各种疏水性和解离常数的 9 种不同药物（利多卡因、曲马多、阿米替林、比哌立登、奥沙西泮、劳拉西泮、氯丙嗪、地尔硫卓和纳洛酮）开展实验（表 1）。Agilent Poroshell 120 色谱柱非常适合该分析，部分原因在于其采用标准 2 µm 筛板，且相对于亚 2 µm 色谱柱能够耐受更复杂的样品。Poroshell 120 的传质过程极其类似于亚 2 µm 颗粒液相色谱柱，且不存在亚 2 µm 颗粒色谱柱的较高反压。高效传质有助于加快分析速度并以最佳分离度获得更高的通量。

表 1. 所研究药物的特性

化合物	CAS 号	Log P	pKa	治疗用途
利多卡因	*137-58-6*	*2.4*	*8.01*	*局部麻醉，抗心律不齐*
曲马多	*27203-92-5*	*2.5*	*9.41*	*镇痛药*
阿米替林	*50-48-6*	*4.92*	*9.4*	*抗抑郁药*
比哌立登	*514-65-8*	*4.0*	*10.8*	*抗胆碱能药*
奥沙西泮	*604-75-1*	*2.23*	*1.7, 11.3*	*抗焦虑药*
劳拉西泮	*846-49-1*	*2.47*	*1.3, 11.5*	*抗抑郁药*
氯丙嗪	*50-53-3*	*5.18*	*9.3*	*抗精神病药*
地尔硫卓	*42399-41-7*	*3.63*	*7.7*	*钙通道阻滞剂*
纳洛酮	*465-65-6*	*1.45*	*7.9*	*阿片类受体拮抗药*
去甲替林 (IS)	*72-69-5*	*5.65*	*9.7*	

实验部分

所有试剂和溶剂均为 HPLC 分析纯级。化合物购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。

将 19.27 g NH_4OAc 粉末溶于 250 mL Milli-Q 水中，制得 pH 为 5 的 1 M 乙酸铵 (NH_4OAc) 储备液。用乙酸将 pH 调节为 5，使用 pH 计进行监测。将溶液储存于 4 °C 下。将 200 mL MeOH 和 800 mL Milli-Q 水混合，并加入 5 mL pH 为 5 的 1 M NH_4OAc 储备液，制得含 5 mM NH_4OAc (pH 5) 的 MeOH:H_2O (20:80)。向 1 L 乙腈 (ACN) 中加入 5 mL 1 M NH_4OAc 储备液 (pH 5)，并充分超声溶解，制得 5 mM NH_4OAc 的 ACN 溶液。

用甲醇制得标样和内标溶液 (2.0 mg/mL)，并储存于 20 °C 下。每天用 1:1 ACN:H_2O (0.1% FA) 配制 5.0 µg/mL 新鲜的 QC 加标溶液。用 1:1 ACN:H_2O (0.1% FA) 配制 0.5 和 5.0 µg/mL 标准溶液，通过适当稀释基质空白萃取物来绘制校准曲线。利用 5 µg/mL 去甲替林的 1:1 ACN:H_2O (0.1% FA) 溶液作为内标 (IS)。

设备

- 配备二极管阵列检测器的 Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪
- 配备电喷雾离子源的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统
- Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 萃取试剂盒（部件号 5982-6755）
- Bond Elut QuEChERS EN 萃取试剂盒（部件号 5982-6650）
- Bond Elut QuEChERS 无缓冲盐萃取试剂盒（部件号 5982-6550）
- 适用于一般水果和蔬菜的 Bond Elut QuEChERS AOAC 分散固相萃取试剂盒（部件号 5982-5022）
- 适用于一般水果和蔬菜的 Bond Elut QuEChERS EN 分散固相萃取试剂盒（部件号 5982-5021）
- Bond Elut 陶瓷均质子（部件号 5982-9312）
- Sorvall ST 16R 离心机 (Thermo IEC, MA, USA)
- 5415D Eppendorf 微型离心机 (Brinkman Instruments, Westbury, NY, USA)
- Geno Grinder 2010 (SPEX CertiPrep, Inc., Metuchen, NJ, USA)
- DVX 2500 多管涡旋仪 (VWR International, West Chester, PA, USA)

HPLC 条件

色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm（部件号 695775-902）
流速	0.4 mL/min
柱温	30 °C
进样量	10 µL
流动相	A. 5 mM 乙酸铵，pH 5，溶于 20:80 MeOH:水中
	B. 5 mM 乙酸铵，pH 5，溶于 ACN 中
进样针清洗	1:1:1:1 ACN:MeOH:IPA:H_2O (0.2% FA)
梯度	5.5 min 内 B 由 20% 增加至 75%

质谱条件

ESI	正离子模式
GT	300 °C
GF	7 L/min
雾化器压力	40 psi
SGT	400 °C
SFG	12 L/min
毛细管电压	3500 V
NV	500 V

分析物的其他质谱条件见表 2。

表 2. 利用 LC/MS/MS 分析 9 种农药的仪器采集数据

化合物	MRM 通道 (m/z)	碎裂电压 (V)	CE (V)	RT (min)	ΔRT
利多卡因	1) 235.18 > 86.1 2) 235.18 > 58.1	97	11 35	1.37	0.4
曲马多	1) 264.2 > 58.1 2) 264.2 > 246.1	97	15 3	1.20	0.4
阿米替林	1) 278.2 > 117 2) 278.2 > 105	112	19 19	4.25	0.4
比哌立登	1) 312.23 > 98.1 2) 312.23 > 55.1	123	19 60	4.23	0.7
奥沙西泮	1) 287.06 > 240.9 2) 287.06 > 268.9	112	19 7	3.99	0.4
劳拉西泮	1) 321.02 > 274.9 2) 321.02 > 302.9	113	15 7	4.09	0.4
氯丙嗪	1) 319.11 > 86.1 2) 319.11 > 58.1	112	15 43	4.63	0.4
地尔硫卓	1) 415.17 > 177.9 2) 415.17 > 149.9	128	19 43	3.73	0.4
纳洛酮	1) 328.16 > 310 2) 328.16 > 212	123	15 39	0.82	0.4
去甲替林 (IS)	1) 264.18 > 233 2) 264.18 > 91	97	7 19	4.17	0.4

通用流程

1. 将 1 mL 全血加入离心管中
2. 加入适当体积的浓储备液，得到 25 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 组分混合物
3. 加入 20 µL IS 储备液，得到 100 ng/mL 去甲替林，并加入两粒陶瓷均质子
4. 涡旋混合
5. 加入 2 mL 乙腈溶液（包含或不包含酸），见表 3
6. 涡旋混合
7. 加入预混合量（见表 3）的萃取盐并剧烈振摇
8. 以 5000 rpm 的转速离心 5 分钟
9. 将 1 mL 萃取液转移到含 50 mg PSA 和 150 mg $MgSO_4$ 的 d-SPE 管（2 mL 离心管）中进行基质净化
10. 涡旋振荡 1 min
11. 以 18000 rpm 的转速离心 3 分钟
12. 移取 200 µL 萃取液至含 800 µL 水的液相色谱样品瓶中
13. 涡旋混合并分析

整个系列实验列于表 3 中。采用 10-250 ng/mL 的基质匹配校准曲线测定回收率。

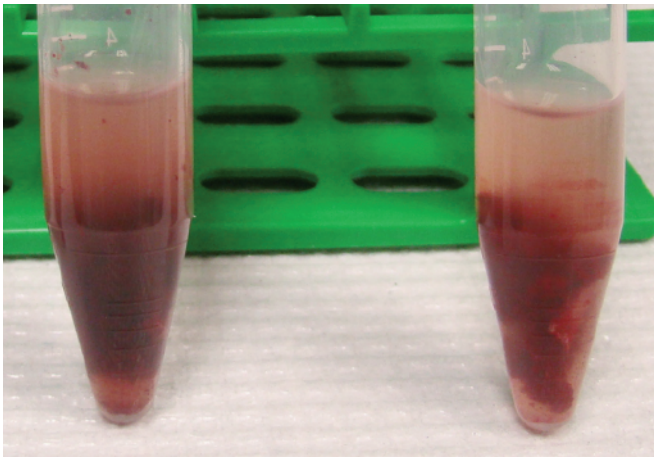
表 3. 研究的系列实验条件

样品 (1 mL)	萃取溶剂	萃取盐 (mg)	d-SPE	观察结果
WB	ACN	无	无	样品：固体
WB	ACN，1% AA	无	无	样品：固体
WB	ACN，0.4% FA	无	无	样品：松散颗粒
WB	ACN，0.4% FA	非缓冲，500	无	深色萃取物
WB	ACN，0.4% FA	AOAC，500	无	干净萃取物
WB	ACN，0.4% FA	EN，650	无	深色萃取物
WB	ACN，0.4% FA	非缓冲，500	50 mg PSA，150 mg $MgSO_4$	干净萃取物
WB	ACN，0.4% FA	AOAC，500	50 mg PSA，150 mg $MgSO_4$	干净萃取物
WB	ACN，0.4% FA	EN，650	25 mg PSA，150 mg $MgSO_4$	干净萃取物
WB	ACN，0.4% FA	EN，650	50 mg PSA，150 mg $MgSO_4$	干净萃取物

WB = 全血；ACN = 乙腈，AA = 乙酸；FA = 甲酸，
PSA = N-丙基乙二胺，AOAC = $MgSO_4$ 和乙酸钠，EN = $MgSO_4$ 和柠檬酸盐缓冲液，
非缓冲 = $MgSO_4$ 和氯化钠

结果与讨论

实验表明，利用 ACN (0.4% FA) 作为萃取溶剂相比于其他萃取溶剂（其中样品呈固体）提供了更好的消解样品（见图 1 和图 2）。AOAC 缓冲盐提供了外观上最干净的萃取物（图 3），选择这种缓冲盐与含 50 mg PSA、150 mg $MgSO_4$ 的 d-SPE 共同用于萃取全血中的药物（图 4）。值得注意的是，d-SPE 步骤事实上实现了对所有被萃取样品的实质性净化，特别是来自 EN 和非缓冲盐萃取物的样品，当初它们的萃取物中残留有大量的红细胞。



A B

图 1. 将 QuEChERS 方法中常用的溶剂 ACN (A) 或 ACN (1% AA) (B) 加入全血中

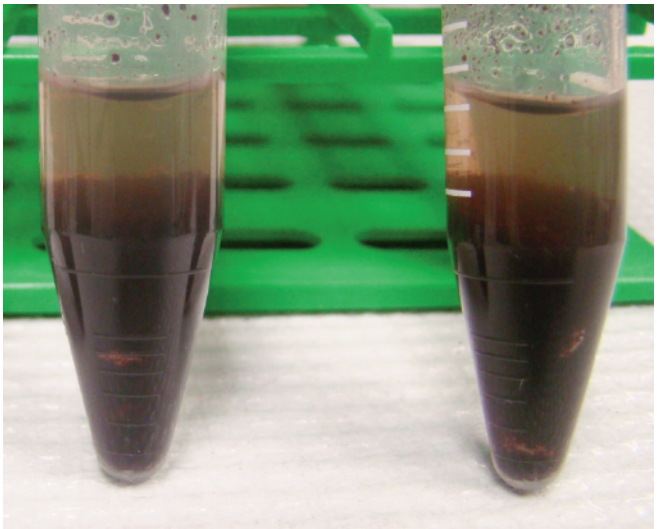
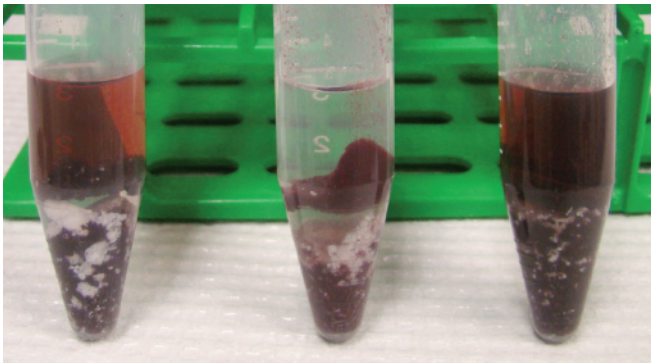
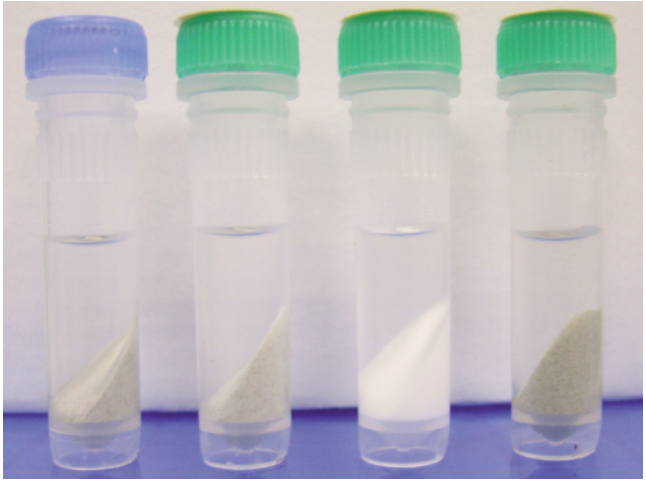


图 2. 将 ACN (0.4% FA) 加入全血中



A B C

图 3. 加入 ACN (0.4% FA)、QuEChERS 盐后，进行振摇和涡旋混合。
A EN 方法柠檬酸盐
B AOAC 方法乙酸盐
C 非缓冲盐方法氯盐



A B C D

图 4. 加入含 150 mg $MgSO_4$ 和不同含量 PSA 的 d-SPE 净化试剂盒后进行萃取。
A EN 柠檬酸盐和 EN d-SPE 25 mg PSA
B EN 柠檬酸盐和 AOAC d-SPE 50 mg PSA
C AOAC 乙酸盐和 AOAC d-SPE 50 mg PSA
D 非缓冲氯盐和 AOAC d-SPE 50 mg PSA

微量萃取流程基于 QuEChERS 方法的原理。这一流程能够替代更复杂的技术，为全血等复杂基质提供了一种简单的样品前处理技术。此类样品前处理技术是 LC/MS/MS 多反应监测 (MRM) 模式强大选择性的极其重要补充。全血萃取物看起来洁净且不含杂质，表明空白全血萃取物对于目标化合物不存在任何干扰。图 5 显示了经微量萃取流程处理后的 10 ng/mL 加标全血样品的色谱图。

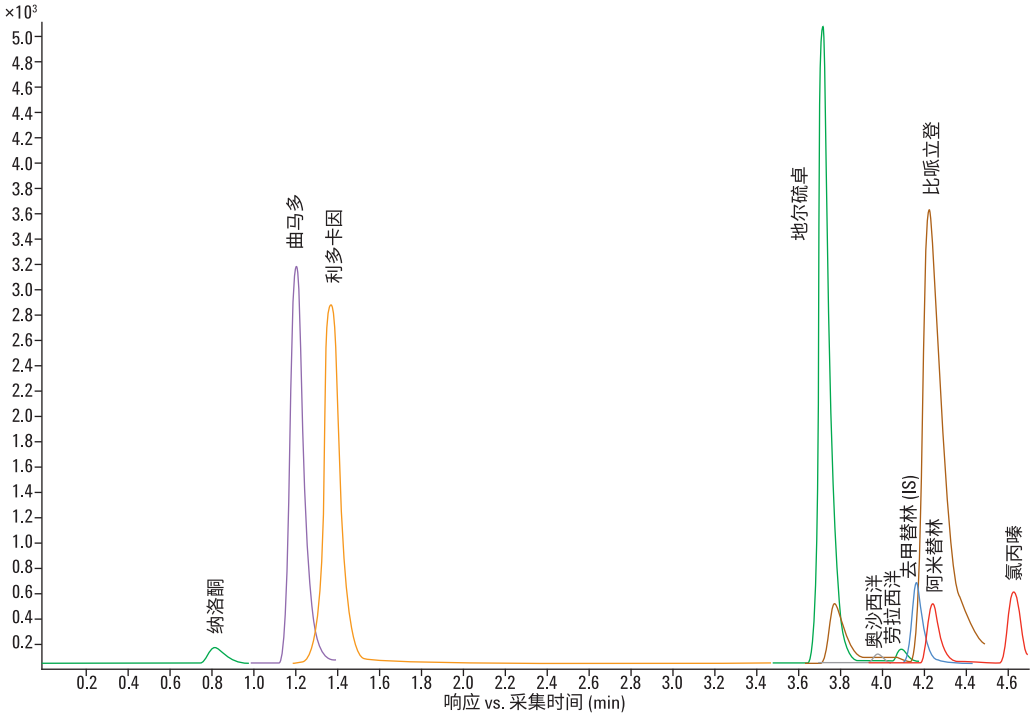


图 5. 经微量萃取后，10 ng/mL 加标全血样品的 LC/MS/MS 色谱图；含 50 mg PSA 和 150 mg $MgSO_4$ 的 AOAC 乙酸盐和 AOAC d-SPE

线性和定量限 (LOQ)

对所有药物进行评估的线性校准范围为 10-250 ng/mL 。配制了用于校准曲线的基质空白萃取物。绘制了加入基质空白萃取物的校准曲线，校准标样的浓度为 10、25、50、100 和 250 ng/mL。所用的去甲替林 (IS) 为 100 ng/mL。对分析物相对响应（分析物峰面积/IS 峰面积）与分析物相对浓度（分析物浓度/IS 浓度）作图，生成校准曲线。图 6 是全血中九种药物的回归方程和相关系数 (R^2) 示例。

回收率与重现性

通过在全血样品中加入 25、50 和 100 ng/mL 的标样来评估回收率和重现性。通过基质加标校准曲线对这些 QC 样品进行定量分析。各浓度水平重复分析六次。回收率和重现性 (RSD) 数据如表 4 所示。

从结果中可以看出，所有药物均获得了可接受的回收率（平均值 > 90%）和精密度（平均值为 7% RSD）。对于所研究的药物，在 < 25 ng/mL 的低浓度下观察到较小程度的基质干扰。

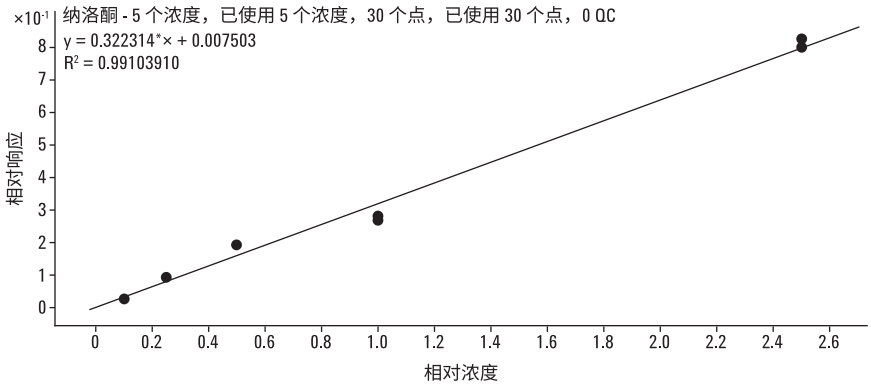


图 6. 微量萃取得到的结果示例，10-250 ng/mL 纳洛酮的标准线性曲线，R^2 = 0.991

表 4. 萃取药物化合物的回收率和 RSD

	加标浓度 25 ng/mL		加标浓度 50 ng/mL		加标浓度 100 ng/mL	
化合物	**回收率**	**RSD**	**回收率**	**RSD**	**回收率**	**RSD**
利多卡因	81.6	35.3	98.7	15.7	100	11.8
曲马多	97.2	18.6	105	3.0	104	8.2
阿米替林	85	13.6	104	2.1	104	8.2
比哌立登	75.5	14.8	97	4.5	99	8.2
奥沙西泮	60.4	17.3	77.0	9.2	78	8.6
劳拉西泮	68.4	17.0	81.9	6.8	81.8	8.6
氯丙嗪	75	14.1	110	10.3	105	6.3
地尔硫卓	63.7	15.8	88.1	2.7	91.7	8.3
纳洛酮	68	12.1	80.6	9.0	75.5	7.7

结论

微量萃取样品前处理是一种简单、易行且经济有效的方法，只需极少样品前处理专业技能、溶剂或设备。用于全血中药物萃取的微量萃取方法提供了另一种便于实验室实施的样品前处理技术。尽管观察到低浓度的某些药物存在基质干扰，但是方法经过改进后包括含额外固相萃取材料的分散固相萃取以便除去基质。Poroshell 120 EC-C18 色谱柱为本研究中所用的各种药物提供了不同的选择性和优异的峰形。

参考文献

1. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Schenk. *J. AOAC Int*. **86**, 4121 (2003)
2. G. Stubbings, T. Bigwood. *Anal. Chim. Acta*, **637**, 68 (2009)
3. R. R. Rasmussen, I. M. L. D. Storm, P. H. Rasmussen, J. Smedsgaard, K. F. Nielsen. *Anal. Bioanal. Chem*. **397**, 765 (2010)
4. D. Smith, K. Lynam. *采用 Agilent J&W DB-35ms 及 DB-XLB 气相色谱柱对鱼肉组织中的 PCB 进行 GC/μECD 分析和确认*。应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5990-6236CHCN (2010)
5. F. Plössl, M. Giera, F. Bracher. *J. Chrom. A*. **1135**, 19 (2006)

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 7 月 3 日，中国出版
5990-8789CHCN

Agilent Technologies

使用 SPE 混合型强阴离子交换聚合物树脂（安捷伦 SampliQ-SAX）对尿液中的酸性、碱性和中性药物进行分离。

Application Note

Drug Discovery

Author

Bellah O. Pule, Lesego C. Mmualefe,
Nelson Torto
Department of Chemistry
Rhodes University
P. O. Box 94
Grahamstown 6140
South Africa

Abstract

针对从尿液中提取酸性、碱性和中性药物的能力对聚合物混合型强阴离子交换树脂安捷伦 SampliQ SAX 进行了评估。实验实施了 SPE 步骤，使得酸性药物洗脱至酸性组分中，而中性和碱性药物则洗脱至中性组分。结果获得较高的回收率（79.6 – 109%）和高重现性（RSD 的范围为 0.06 – 1.12%）。在 0 到 10 µg/mL 的浓度范围内，去甲替林、酮基布洛芬和萘普生的校准曲线均呈线性（$r^2 > 0.999$）。而司可巴比妥则在 0 – 25 µg/mL 的浓度范围内呈线性。司可巴比妥、去甲替林、酮基布洛芬、萘普生的检测限分别为 0.21 µg/mL、0.04 µg/mL、0.03 µg/mL、0.02 µg/mL，定量限为 0.81 µg/mL、0.12 µg/mL、1.04 µg/mL、2.74 µg/mL。

Agilent Technologies

Introduction

Various domains, such as forensic science, toxicology, doping control and therapeutic drug monitoring employ solid phase extraction (SPE) prior to chromatographic analysis. In bioanalysis, urine and blood present a very complex matrix for the determination of drugs and their metabolites. Therefore, sample preparation for cleanup and preconcentration of analytes to improve their detection is very important.

The fractionation of different classes of drugs (acidic, basic and neutral) in biological fluids has been reported in a number of studies [1- 4]. Protein precipitation, liquid-liquid extraction (LLE) and SPE are among the most popular sample preparation techniques. The versatility of SPE allows for the preferential use of the technique, as it is not only employed for class fractionation but also for trace enrichment and purification. Commercial sorbents such as chemically-modified silica gel, polymer and graphitized or porous carbon are available [5]. These offer interactions based on normal phase, reversed phase, ion exchange and mixed mode ion exchange (combination of reversed phase and ion exchange) mechanisms. The mixed mode sorbents have proven to give cleaner extracts and better separations than standard reversed phase or ion exchange sorbents since they take advantage of both the ion exchange and hydrophobic interactions [6].

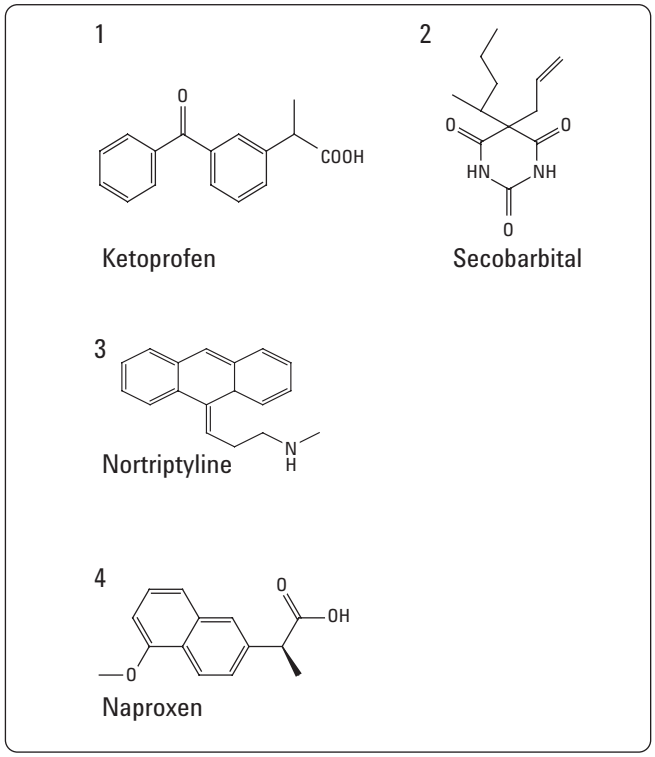


Figure 1. Structures of the drugs used: ketoprofen and naproxen (acidic), secobarbital (neutral) and nortriptyline (basic).

In the present study, a method based on SPE was developed for the fractionation of acidic, basic and neutral drugs in urine with Agilent SampliQ-SAX, a mixed mode strong anion exchange polymer. The resin is a tertiary amine-modified divinylbenzene polymer that exhibits both anion exchange and reversed phase behavior. In addition, it provides excellent reproducibility and enables a simple extraction protocol. Specific drugs (Figure 1) were used as representatives of the three classes of drugs (acidic, basic and neutral).

Experimental

Chemicals

Ketoprofen, secobarbital, nortriptyline and naproxen were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). Phosphoric acid, formic acid and potassium hydroxide were purchased from Merck Chemicals (Gauteng, South Africa) while the HPLC-grade methanol (MeOH) was from Merck KGaA (Darmstadt, Germany) and potassium dihydrogen phosphate was purchased from Saarchem Analytical (Krugersdorp, South Africa).

The mobile phase was prepared with ultrapure water (18.2 MΩcm) from a MilliQ system by Millipore (Milford, Mass, USA) and filtered through a Whatman membrane filter (47 mm diameter and 2 µm pore size). The stock solutions (1000 ppm) of the four analytes were prepared in methanol and kept at 4 °C while the working solutions were prepared daily by diluting the stock solutions, to appropriate concentrations, in methanol. The urine was from a donor who was not using or has not used the drugs investigated in this study.

Instrumental

The analysis was performed on an Agilent 1200 Series High Performance LC System (HPLC) equipped with a binary pump and a diode array detector (DAD) set at λ = 222 nm. Separation of the compounds was achieved on an Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 column (4.6 mm × 75 mm, 3.5 µm, Agilent p/n 959933-902). The data was processed by Agilent ChemStation HPLC-2D software. The SPE cartridges were Agilent SampliQ SAX, 1-mL/30 mg containing a polymeric anion exchanger with 25-35 µm average particle size (Agilent p/n 5982-3313). A Jenway 3510 pH meter (London, UK) was employed for pH adjustments.

Sample pretreatment: SPE procedure

A 5-mL amount of urine was hydrolyzed with 1 M KOH at 60°C for 15 min and diluted with 10 mM CH_3COONa (1:1 v/v). The pH was then adjusted to 2 with phosphoric acid. The urine sample, unspiked (blank) and spiked with drugs, was loaded onto the SampliQ SAX cartridges using the conditions shown in Figure 2. This SPE procedure was optimized for maximum recovery and reproducibility of experimental results.

Separation and Analysis

The HPLC conditions are shown in Table 1.

Table 1. HPLC Conditions

Column	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm × 75 mm, 3.5 µm
Flow rate	1.5 mL/min
Column temperature	30 °C
Injection volume	5 µL
Mobile phase	Isocratic elution
	A: 55% CH_3OH
	B: 45% 25 mM KH_2PO_4, pH 7
Run time	8 min
Post time	1 min
Detection:	DAD @ 222 nm

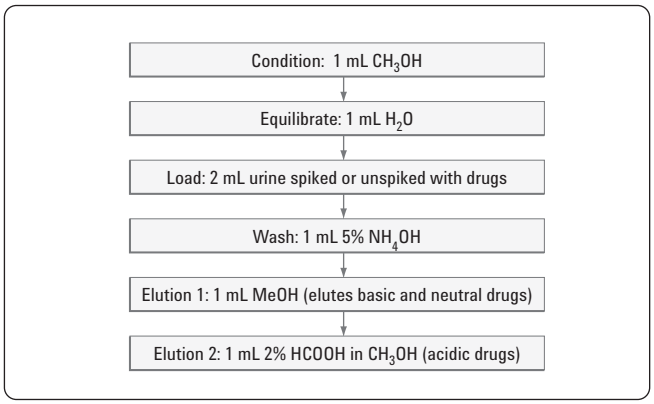


Figure 2. SPE procedure for acidic, basic, and neutral drugs using SampliQ SAX.

Results and Discussion

Separation

The chromatogram of a standard solution containing secobarbital, nortriptyline, naproxen and ketoprofen is shown in Figure 3. A baseline separation of these standards was obtained. Under the conditions used in Table 1, all analytes were eluted within 9 min.

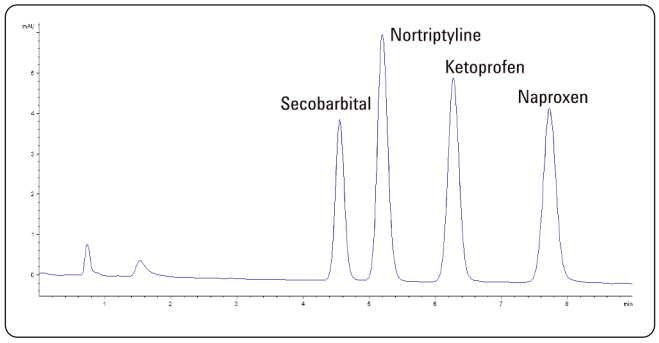


Figure 3. Chromatogram of a standard solution (5 µL) containing 1) secobarbital (10 µg/mL), 2) nortriptyline (5 µg/mL), 3) ketoprofen (5 µg/mL) and 4) naproxen (2 µg/mL).

Analysis of standard solutions

Calibration curves were constructed in the concentration range 0.0-8.0 µg/mL for nortriptyline and ketoprofen, 0-7 µg/mL for naproxen and 0-35 µg/mL for secobarbital as shown in Figure 4. Good linearity was obtained with $r^2 > 0.999$. Due to the diverse polarities and pH characteristics of the compounds tested each one was monitored at its maximum absorption wavelength (Table 2). It can be seen that secobarbital gave a weak response compared to the other drugs in the standard mix. Therefore, in later experiments, the concentration of this drug was adjusted upward to provide a stronger signal.

Table 2. Chemical and Physical Characteristics of the Studied Drugs

Drug	Classification	Log P	pKa	λmax (nm)
Secobarbital	Neutral	1.97	7.90	222
Nortriptyline	Basic	4.28	9.70	242
Ketoprofen	Acidic	0.97	5.94	258
Naproxen	Acidic	3.18	4.53	230

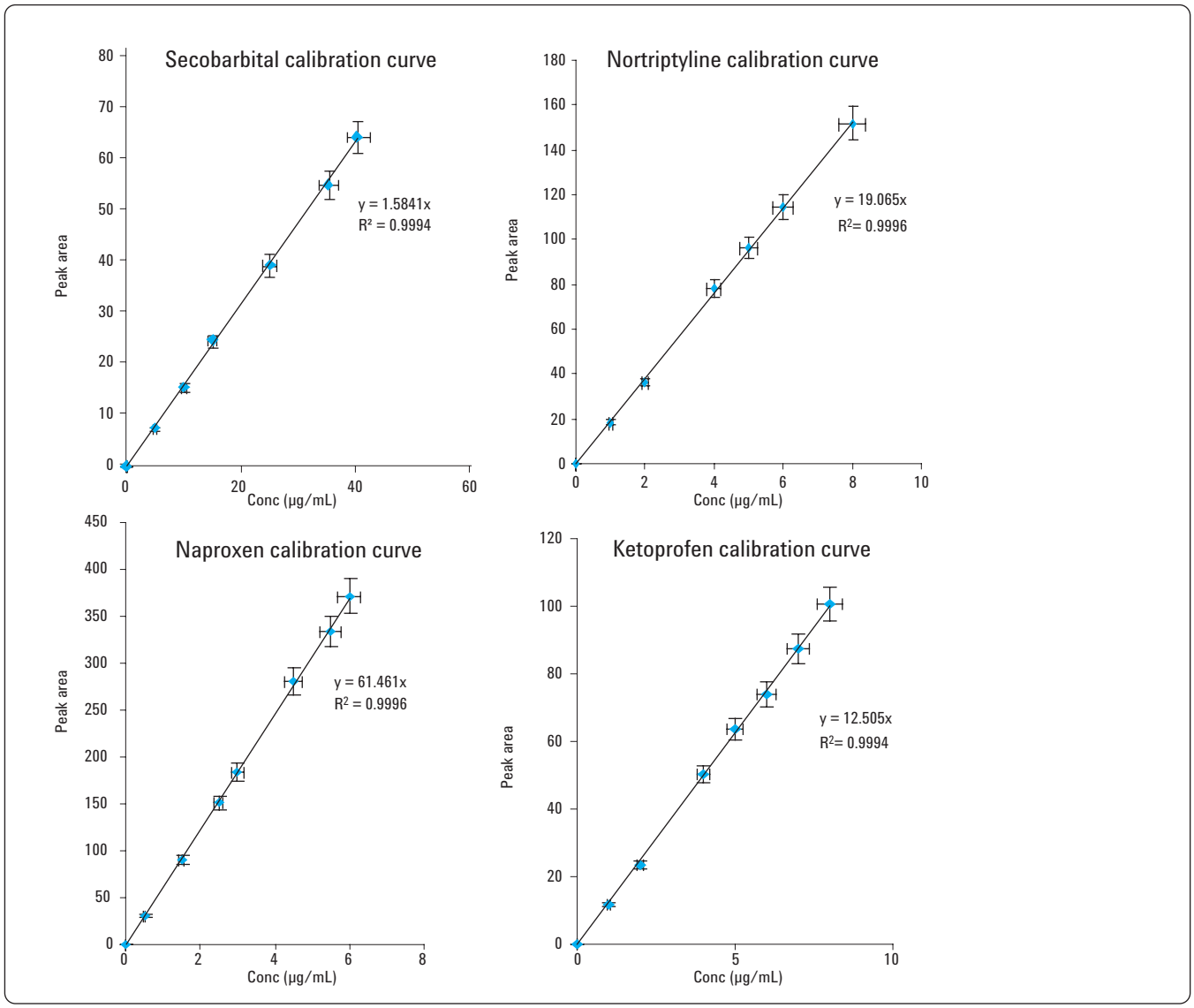


Figure 4. Calibration curves (at the λ max of each) for secobarbital, nortriptyline, ketoprofen and naproxen.

Solid phase extraction procedure for drugs in urine

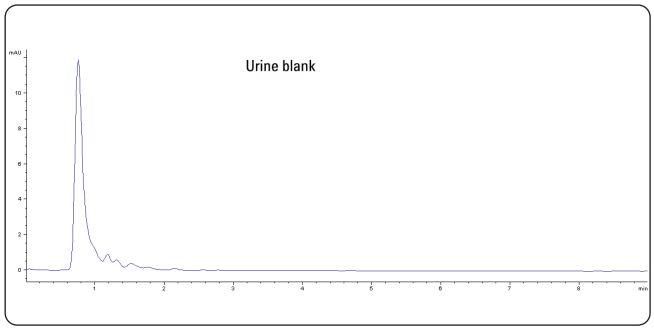
Agilent SampliQ SAX, a polymeric mixed-mode, strong anion exchange SPE sorbent was successfully used to simultaneously extract acidic, basic and neutral drugs from a spiked urine sample using the SPE procedure depicted in Figure 2. First, blank urine containing no drugs was treated using the SPE method. Figures 5a for the basic and neutral elution conditions showed nothing eluting in the region of the acidic and neutral drugs in the standards. Figure 5b, which depicts a blank urine using the acidic elution conditions, also showed nothing eluting in the region of the acidic drugs. For the spiked urine samples, the neutral (secobarbital) and basic (nortriptyline) drugs were eluted in the neutral fraction (Figure 6a) since they were retained through hydrophobic interactions. The acidic drugs (naproxen and ketoprofen), retained by the strong anion exchange functionalities of the sorbent, eluted separately in the acidic fraction, as shown in Figure 6b. A small amount (< 10%) of the neutral/basic drugs were also found in the acidic fraction. A larger volume of methanol in the prior step could have been used to improve extraction efficiency.

Recovery and reproducibility

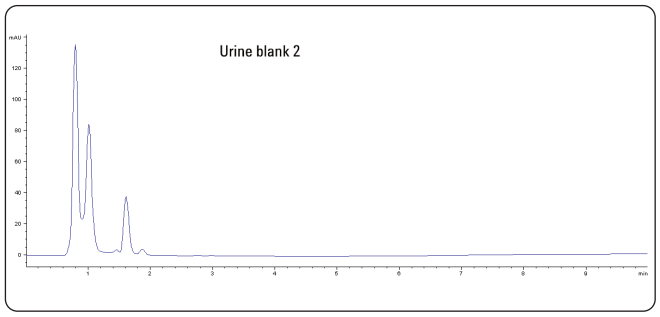
The recoveries were calculated by comparing the peak area of the analyte concentration in the spiked urine after SPE to that of the standard solution at the same concentration level. To demonstrate reproducibility the samples were analyzed at three different concentration levels (n = 6). As indicated in Table 3, high recoveries (> 85%) were obtained except for the lowest level of secobarbital. The RSD values were excellent and ranged from 0.06 to 1.12 for n = 6 runs.

Table 3. Recoveries for Secobarbital, Nortriptyline, Ketoprofen and Naproxen from Urine

Drug	SPE fraction	Spike level (µg/ml)	Recovery	%RSD` (n=6)
Secobarbital	Neutral	5	79.63	1.12
		10	92.70	0.78
		15	86.47	0.31
		1	91.20	1.04
Nortriptyline	Neutral	2.5	86.48	0.47
		4	85.32	0.12
		1	109.34	0.54
Ketoprofen	Acidic	2.5	99.18	0.58
		4	85.88	0.16
		0.5	106.97	0.18
Naproxen	Acidic	1	87.66	0.63
		2.5	83.41	0.06



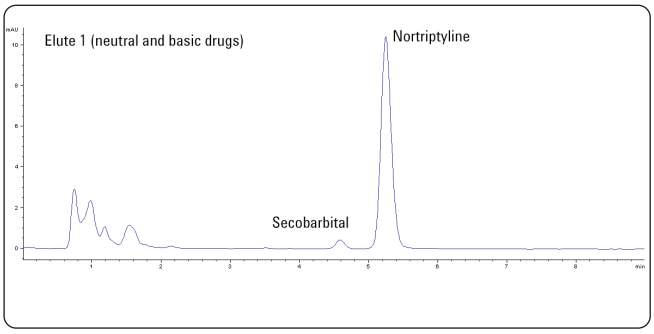
a.



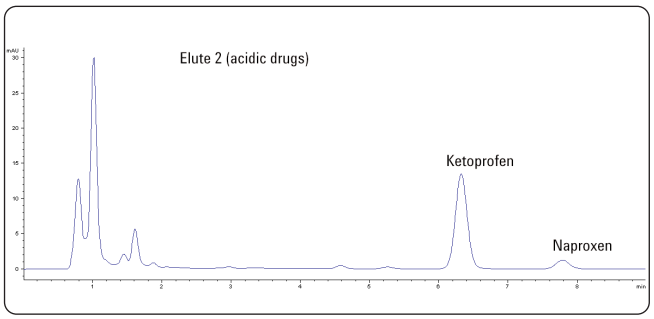
b.

Figure 5a. Chromatograms of blank urine extract by SPE method using Elution 1 for neutral and basic compounds (see Figure 2).

Figure 5b. Chromatograms of blank urine extract by SPE method using Elution 2 for acidic compounds (see Figure 2).



a.



b.

Figure 6a. Chromatograms of neutral and basic drugs (Elution 1) extracted from spiked urine: 1) secobarbital and 2) nortriptyline.

Figure 6b. Chromatograms of acidic drugs (Elution 2) extracted from spiked urine: 3) ketoprofen and 4) naproxen.

Linearity, limits of detection and limits of quantification

After SPE was performed, the method linearity as well as the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined. Linearity was determined in the concentration range 0-25 µg/mL for secobarbital and 0 – 10 µg/mL for nortriptyline, ketoprofen, and naproxen. Secobarbital and nortriptyline were linear in the chosen range while ketoprofen and naproxen showed linearity from 0 – 4.5 µg/mL. Table 4 shows the linearity equations and correlation coefficients.

Table 4. Linearity after SPE

	Concentration range (0 – 8 µg/ml)	
Drugs	**Linear equation**	**Correlation coefficient (r^2)**
Secobarbital	$y = 1.3325x$	$r^2 = 0.9993$
Nortriptyline	$y = 17.595x$	$r^2 = 0.9991$
Ketoprofen	$y = -1.2748x^2 + 17.896x$	$r^2 = 0.9991$
Naproxen	$y = -1.9003x^2 + 33.527x$	$r^2 = 0.9993$

The LOD and LOQ results are shown in Table 5. The following equations 1 and 2 were used to calculate LOD and LOQ, where Syx = standard error of the regression line and b = gradient.

$$LOD = \frac{3.3 \times Syx}{b} \qquad \text{Equation 1}$$

$$LOQ = \frac{10.0 \times Syx}{b} \qquad \text{Equation 2}$$

Table 5. LOD and LOQ for the Analytes

Drug	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Secobarbital	0.21	0.81
Nortriptyline	0.04	0.12
Ketoprofen	0.03	1.04
Naproxen	0.03	2.74

Conclusion

The SPE method employed is relatively simpler than other protocols reported in literature. With the strong anionic exchange polymer, Agilent SampliQ SAX, the simultaneous extractions of acidic drugs, a basic drug and a neutral drug from a spiked urine matrix were obtained. High recoveries and good reproducibilities were achieved for extraction of all drugs from the urine.

References:

1. M. A. Allabdalla, J. Clinical Forensic Medicine. 12 (2005) 310-315.
2. K. B. Borges, Talanta 78 (2009) 233-241.
3. N. H Yu, E.N.M Ho, F.P.W Tang, T.S.M Wan, A.S.Y. Wong, J. Chromatogr. A 1189 (2008) 426-434.
4. S. Weigel, R Kallenborn, H. Huhnerfuss J. Chromatogr. A 1023(2004) 183-195.
5. A. Zwir-Ferenc, M. Bizziuk, J.Env 15 (2006) 677-690.
6. M. S. Landis, J. Pharm. Biomed. Anal. 44(2007) 1029-1039.
7. K. A. Shaikh, S. D. Patil, A. B. Devkhile. J.Pharm. Biomed. Anal. 48(2008) 1481-1484.

www.agilent.com/chem

Agilent shall not be liable for errors contained herein or for incidental or consequential damages in connection with the furnishing, performance, or use of this material.

Information, descriptions, and specifications in this publication are subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc., 2009
Printed in the USA
November 12, 2009
5990-4965EN

Agilent Technologies

使用 SPE 混合型强阳离子交换聚合物树脂（安捷伦 SampliQ SCX）对血浆中的酸性、碱性和中性药物进行分离。

Application Note

Drug Discovery

Authors

Bellah O. Pule, Lesego C. Mmualefe,
Nelson Torto
Department of Chemistry
Rhodes University
P. O. Box 94
Grahamstown 6140
South Africa

Abstract

本研究开发了一种从加标的人体血浆样品中同时提取多种药物（安非他明、对乙酰氨基酚、对甲苯酰胺、间甲苯胺和苯巴比妥）的方法。此过程采用混合型强阳离子交换树脂安捷伦 SampliQ SCX 进行了固相萃取。固相萃取物的色谱分离和分析条件如下：流动相为 30% 甲醇和 70% 磷酸二氢钾（以等度条件运行）；色谱柱为安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18（4.6 mm×75 mm，3.5 µm）；流速为 1mL/min；二极管阵列检测器设置在 210 nm。所有分析物的分析结果回收率都较高（> 80%）且具有高度可重现性。对乙酰氨基酚的检测限（LOD）和定量限（LOQ）分别为 0.39 和 0.71 µg/mL，安非他明为 0.84 和 1.87 µg/mL，间甲苯胺为 0.36 和 1.06 µg/mL，对甲苯酰胺为 0.66 和 0.70 µg/mL，苯巴比妥为 0.80 和 1.89 µg/mL。

Agilent Technologies

Introduction

Sample preparation prior to chromatographic analysis presents a major challenge for the determination of drugs and their metabolites in complex matrices such as biological fluids (for example, blood, plasma, urine, serum, saliva). Drugs normally exhibit a diverse polarity with acidic, basic or neutral functionalities depending on the pH of the matrix. Liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE) have traditionally been employed for the extraction of drugs, their metabolites and endogenous compounds from plasma [1-2]. Their quantification at a low concentration has proven to be a difficulty in pharmaceutical analysis. SPE is however the preferred method, as it is not only employed for class fractionation but also for trace enrichment and purification. Available commercial sorbents such as chemically modified silica gel, polymer and graphitized or porous carbon are used [3]. These offer separations based on normal phase, reversed phase, ion exchange and mixed mode ion exchange (combination of reversed phase and ion exchange) sorbents. The mixed mode sorbents have proven to give cleaner extracts and better separations than standard reversed phase or ion exchange sorbents as they take advantage of both the ion exchange and hydrophobic interactions [4-5]. For the extraction of compounds with a wide variety of polarity, polymeric sorbents have proven to be superior to other sorbents (for example, alkylated silica) and are therefore the choice of sorbent for this study [6-8].

In this application note a method employing solid phase extraction is developed for the fractionation of acidic, basic and neutral drugs from plasma with Agilent SampliQ SCX, a mixed mode strong cation exchange polymer. The resin is a sulfonic acid modified divinyl benzene polymer that exhibits both cation exchange and reversed phase behavior. In addition, it provides excellent reproducibility and enables a simple extraction protocol. Specific drugs (Figure 1) have been used as representatives of the three classes of drugs for example p-toluamide (acidic), amphetamine (basic) and acetaminophen (neutral).

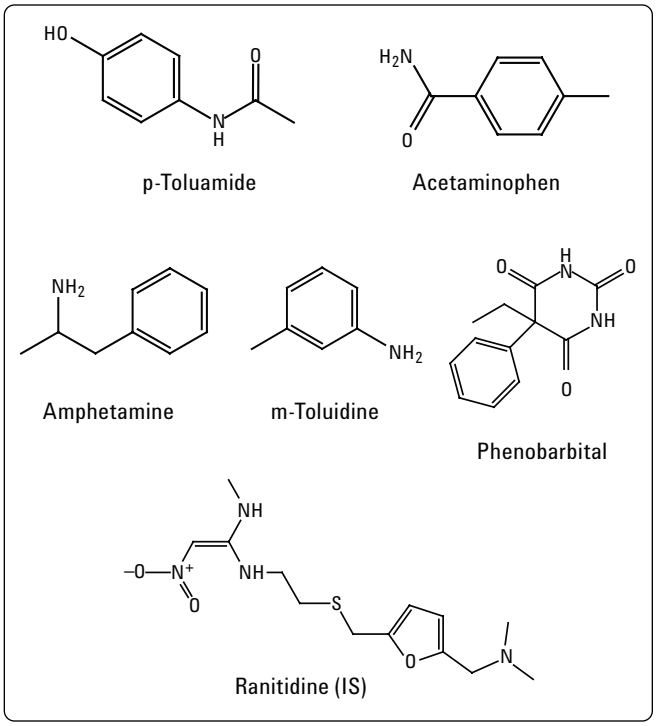


Figure 1. Structures of drugs used in present study.

Experimental

Chemicals

Acetaminophen, phenobarbital, p-toluamide, amphetamine, m-toluidine and ranitidine (IS) were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). Phosphoric acid, formic acid and potassium hydroxide were purchased from Merck Chemicals (Gauteng, South Africa) while the HPLC grade methanol was from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), dipotassium hydrogen phosphate and potassium dihydrogen phosphate were purchased from Saarchem Analytical (Krugersdorp, South Africa).

The mobile phase was prepared with ultrapure water (18.2 M Ωcm) from a MilliQ system by Millipore (Milford, Mass, USA) and filtered through a Whatman membrane filter (47 mm diameter and 0.2 µm pore size). The stock solutions of the drugs and the internal standard were prepared in methanol (1000 µg/mL) and kept at 4 °C while the working solutions were prepared daily by diluting the stock solutions, to appropriate concentrations, also in methanol. The plasma (ECZ HQ Donation 5497780, O^+) was from SANBS (Port Elizabeth, South Africa).

Instrumental

The analysis was performed on an Agilent 1200 Series HPLC composed of a binary pump and a diode array detector (DAD) set at λ = 210 nm. Separation of the compounds was achieved on an Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 column (4.6 mm x 75 mm, 3.5 µm, p/n 959933-902, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The data was processed by HPLC 2D ChemStation software. The solid phase extraction cartridges were Agilent SampliQ SCX, 1-mL/30 mg, p/n 5982-3213, a polymeric strong cation exchanger with 25–35 µm average particle sizes. A Jenway 3510 pH meter (London, UK) was employed for pH adjustments.

Sample pretreatment: SPE procedure

The plasma sample (1 mL) was hydrolyzed with 1% formic acid (3 mL) for 30 min. The sample, spiked with drugs, was then loaded onto the SampliQ SCX cartridges, as described in Figure 2. An internal standard, 50 µL of the ranitidine stock solution, was added to each SPE fraction. A blank plasma sample (1 mL) was carried through the procedure also.

Separation and analysis

The reversed-phase chromatographic conditions were as shown in Table 1. All drugs were separated within five minutes.

Table 1. HPLC Conditions

Column:	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 mm × 75 mm, 3.5 µm
Flow rate:	1.5 mL/min
Column temperature:	35 °C
Injection volume:	5 µL
Mobile phase:	Isocratic elution: 30/70 A/B A: CH_3OH B: 25 mM K_2HPO_4, pH 7

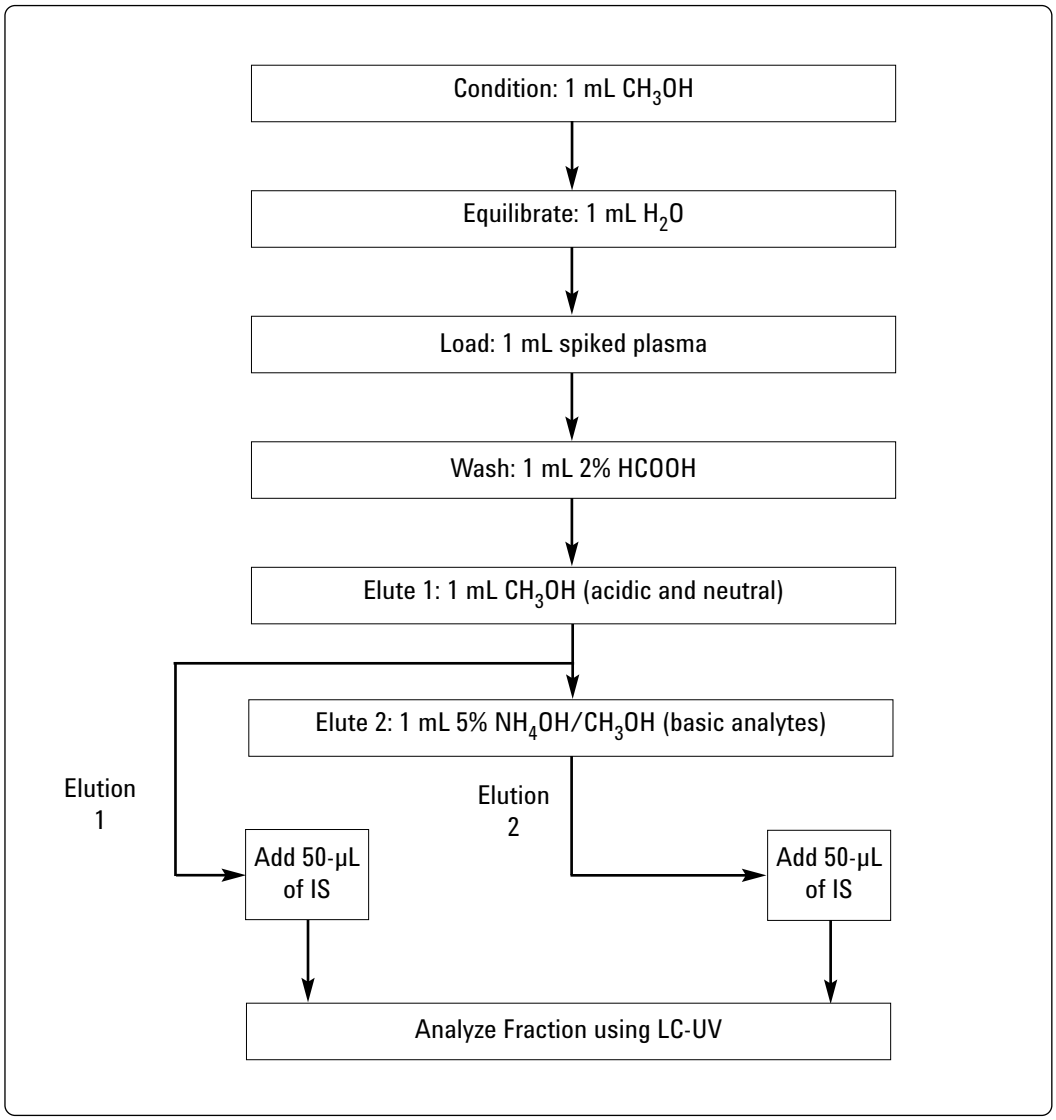


Figure 2. SPE procedure.

Results and Discussion

Separation

The standard mixture of the analytes was separated with the set chromatographic conditions (Table 1) and the chromatogram is reported in Figure 3.

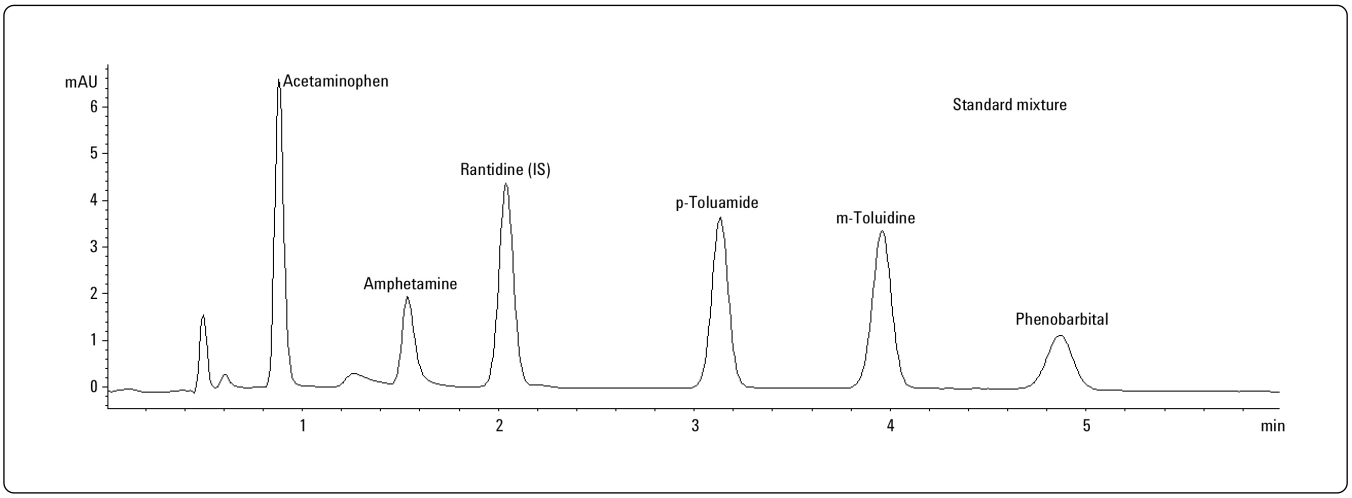


Figure 3. Chromatogram of a standard mixture (7 µg/mL): [1] acetaminophen [2] amphetamine [3] p-toluamide [4] m-toluidine [5] phenobarbital ranitidine (IS).

Analysis of standard solutions

Calibration curves were processed at 0–10 µg/mL concentration ranges for all the analytes. They were linear with coefficient of regression (r^2) greater than 0.999 as shown in Figure 4.

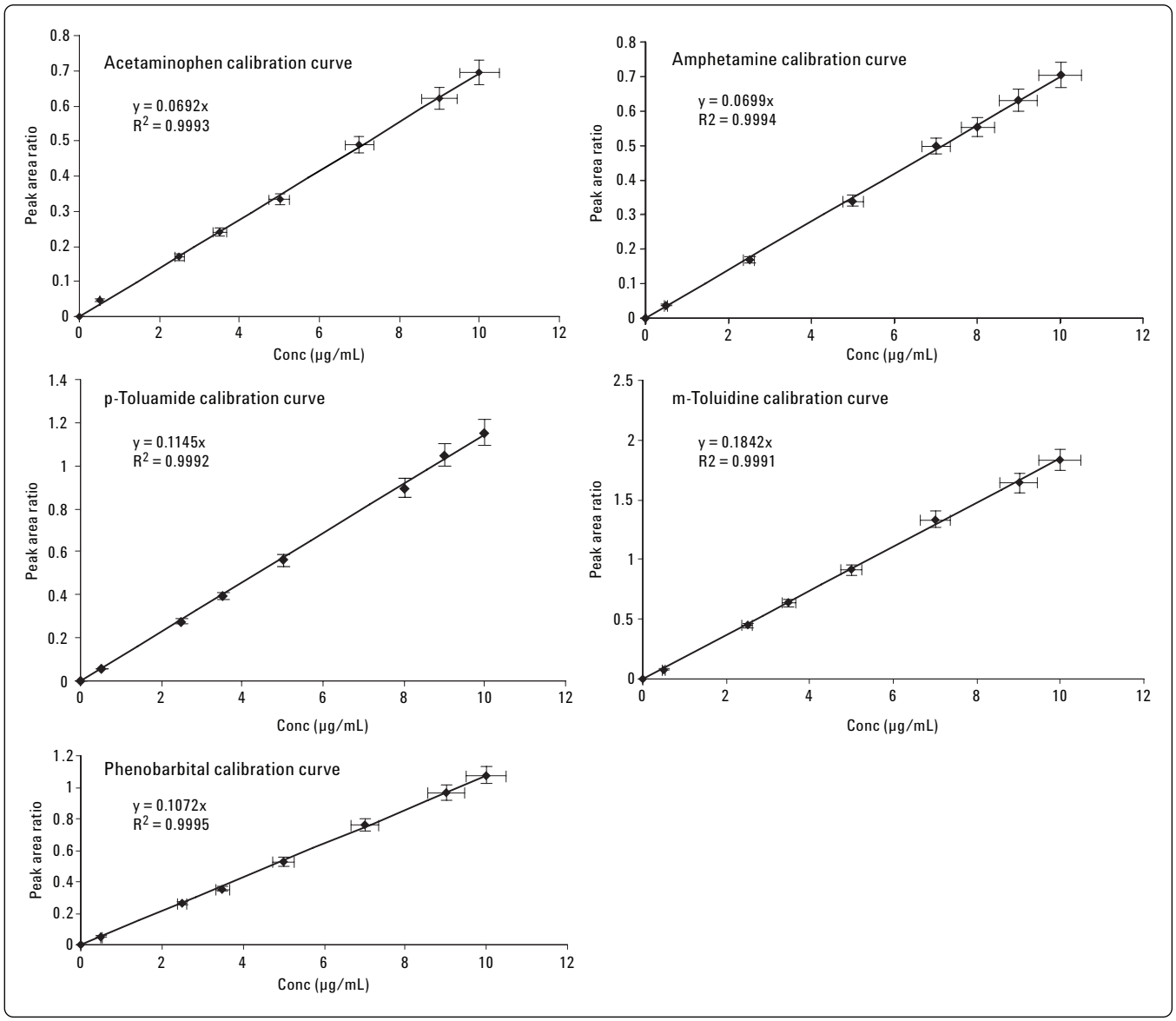


Figure 4. Calibration curves of the standards.

Solid phase extraction procedure

A mixed mode strong cation exchange sorbent was used to extract basic drugs from the acidic and neutral drugs in plasma. The acidic and the neutral drugs which exhibit a similar retention mechanism to that of the undissociated acidic compounds were adsorbed in the hydrophobic portion of the sorbent and eluted in the neutral fraction while the basic drugs were retained by the cation exchange interactions with the sorbent and eluted in the ammoniated fraction.

First, blank urine containing no drugs was treated using the SPE method. Figure 5a for the acidic and neutral elution conditions (Elution 1) showed nothing eluting in the region of the acidic and neutral drugs in the standards. Figure 5b which depicts a blank urine using the basic elution conditions (Elution 2) also showed nothing eluting in the region of the acidic drugs. For the spiked urine samples, the neutral and acidic drugs were eluted in the neutral fraction (Figure 6a, Elution 1) since they were retained through hydrophobic interactions while the basic drugs, retained by the strong anion exchange functionalities of the sorbent, eluted separately in the basic fraction, as shown in Figure 6b, Elution 2. A small amount (< 10%) of the neutral/acidic drugs were also found in the basic fraction. A larger volume of methanol in the prior step could have been used to improve extraction efficiency.

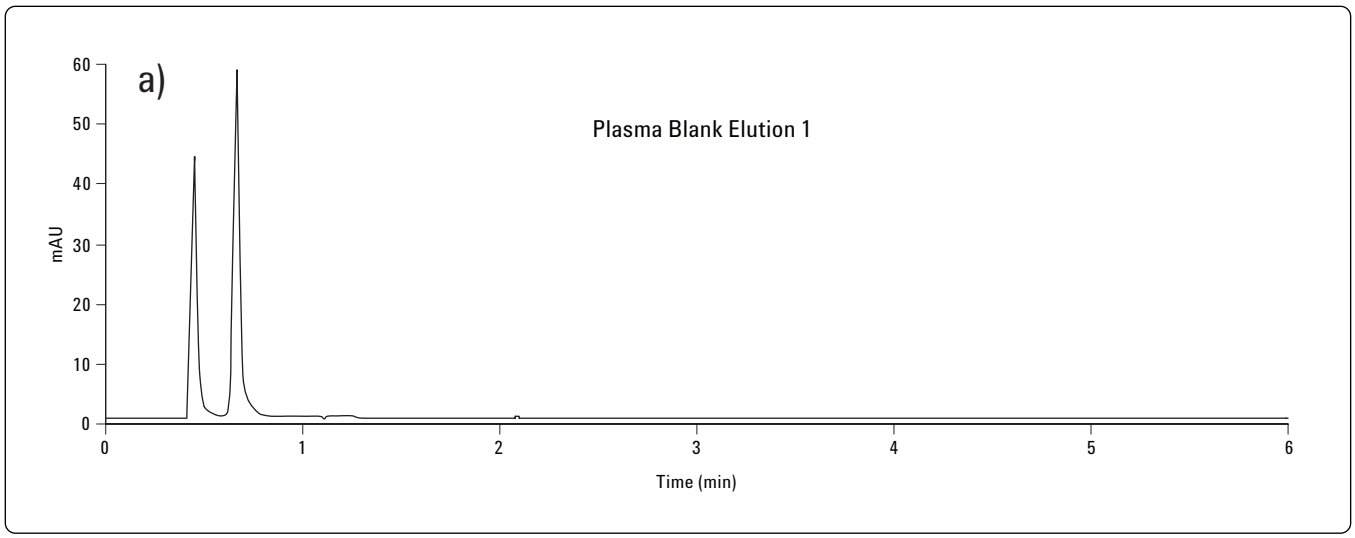


Figure 5a. Chromatograms of blank plasma sample from elution 1.

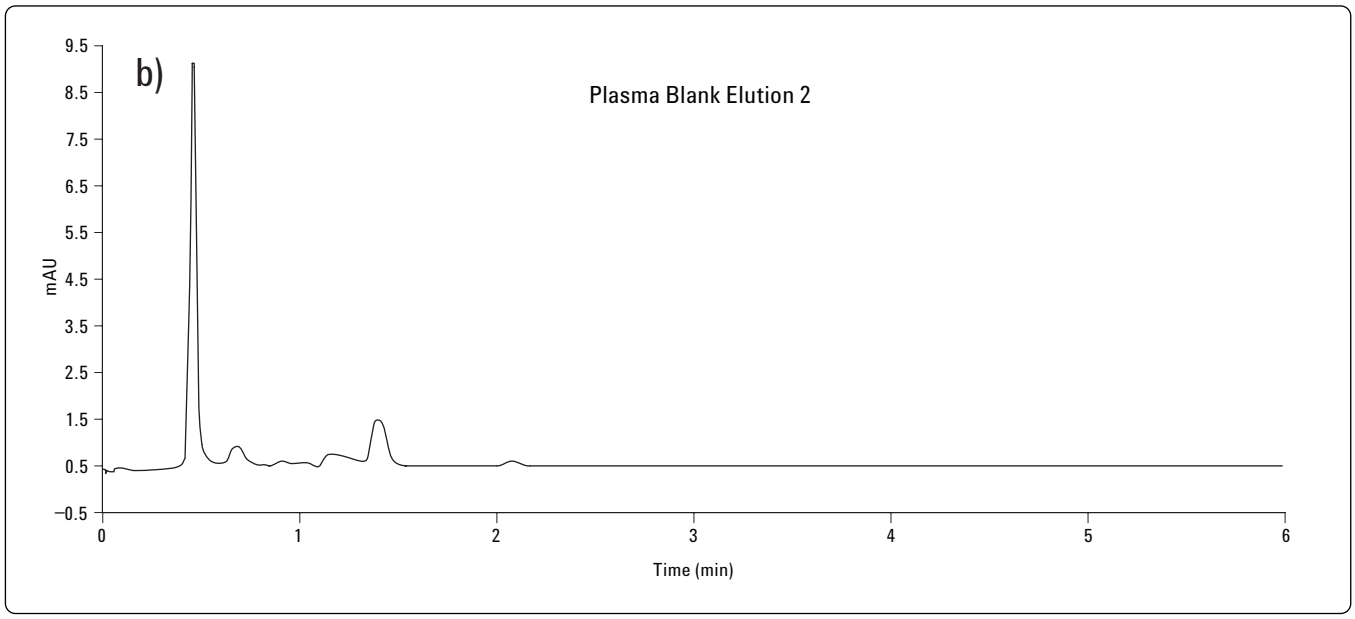


Figure 5b. Chromatograms of blank plasma sample from elution 2.

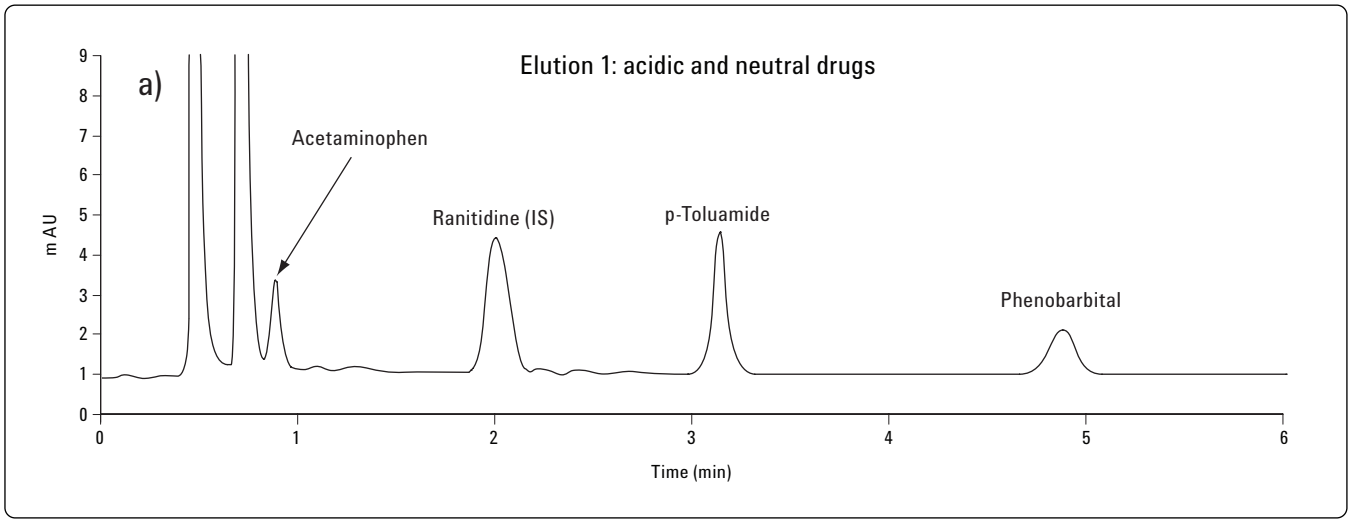


Figure 6a. Chromatograms of drugs in plasma, elution 1: 1. acetaminophen, 2. ranitidine (IS), 3. p-toluamide and 4. phenobarbital.

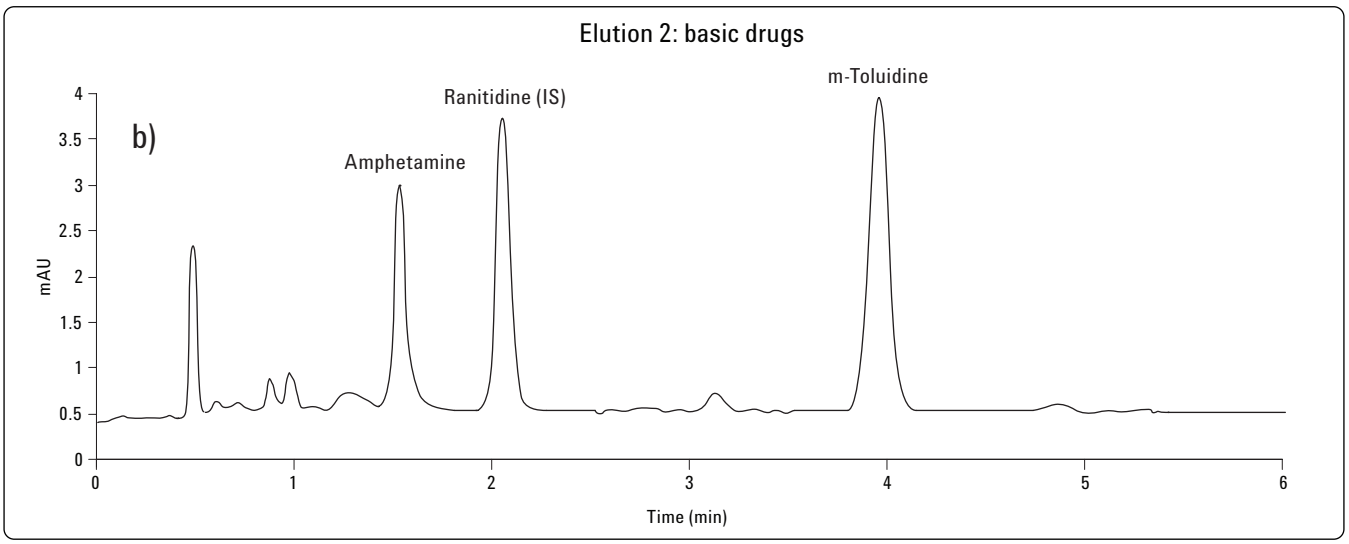


Figure 6b. Chromatograms of drugs in plasma, elution 2: 1. amphetamine, 2. ranitidine (IS), 3. m-toluidine.

Linearity, limits of detection and limits of quantification

The blank plasma was spiked with the analytes at five different concentrations and subjected to the SPE procedure in Figure 2. 50 µL of the internal standard was added. Each spiked plasma sample was prepared in triplicate. The analyte/IS peak area ratios were plotted against the corresponding concentrations. All the analytes were linear in the chosen concentration range (0–8 µg/mL) with $r^2 > 0.999$ as shown in Table 2.

Table 2. Linearity of the Method Employing SPE

	Concentration range (0–8 µg/mL)	
Drugs	**Linear equation equation (y)**	**Correlation coefficient (r^2)**
Acetaminophen	0.099x	0.9999
Amphetamine	0.0853x	0.9991
p-Toluidine	0.138x	0.9990
m-Toluamide	0.1804x	0.9991
Phenobarbital	0.1526x	0.9991

The following equations 1 and 2 were used to calculate LOD and LOQ, where Syx is the standard error of the regression line and b is the gradient.

Equation 1

$$LOD = \frac{3.3 \times Syx}{b} \quad (1)$$

Equation 2

$$LOQ = \frac{10.0 \times Syx}{b} \quad (2)$$

Table 3 shows the limits of detection and quantification determined for each analyte.

Table 3. LOD and LOQ for the Analytes

Drug	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Acetaminophen	0.39	0.85
Amphetamine	0.71	1.87
p-Toluamide	0.66	0.70
m-Toluidine	0.35	1.06
Phenobarbital	0.82	1.89

Recovery and reproducibility studies

Spiked plasma samples at three concentration levels: 0.5-, 2.5- and 5-µg/mL, corresponding to the lower, middle and upper limit of the linearity curve, were subjected to SPE clean-up. The analyte chromatographic peak areas obtained were compared to those obtained from standard solutions at the same concentration and the percentage extraction yield was calculated. To demonstrate reproducibility the samples were analyzed at the three mentioned concentration levels (n = 6). Good recoveries were obtained as indicated in Table 4.

Conclusions

The SPE procedure was successfully carried out on Agilent SampliQ SCX sorbents for the simultaneous extraction of acidic, basic and neutral drugs from plasma with high and reproducible recoveries (> 80%). The LOD ranged from 0.39 to 0.84 µg/mL for the drugs studied. The LOQ ranged from 0.71 to 1.89 µg/mL. This method can be applied to compounds that exhibit a diverse polarity and acidic, basic or neutral functionalities.

Table 4. Recoveries for the Drugs in the Study

		Spike level (µg/mL)					
		0.5		2.5		5	
Drugs	Class	Recovery	%RSD	Recovery	%RSD	Recovery	%RSD
Acetaminophen	Neutral	81.45	0.41	95.08	0.48	92.62	0.22
Amphetamine	Basic	83.16	0.62	88.83	1.09	86.64	0.28
p-Toluamide	Acidic	85.88	0.65	96.86	0.18	94.40	0.07
m-Toluidine	Basic	81.97	0.51	89.16	0.33	94.86	0.10
Phenobarbital	Acidic	85.49	0.39	90.13	0.25	80.48	0.21

References

1. A. Zwir-Ference, M. Bizziuk, *J. Env* 15 (2006) 677-690.
2. K. B. Borges, Talanta 78 (2009) 233-241.
3. K. A. Shaikh, S. D. Patil, A. B. Devkhile, *J. Pharm. Biomed. Anal* 48 (2008) 1481-1484.
4. M. S. Landis *J. Pharm. Biomed. Anal*. 44(2007) 1029-1039.
5. L. Mercolini, G. Gerra, M Consorti, L. Somaini, M. A. Raggi, Talanta 78 (2009) 150-155.
6. M. A. Allabdalla, *J. Clinical Forensic Medicine*. 12 (2005) 310-315.
7. N. H Yu, E. N. M Ho, F. P. W Tang, T. S. M Wan, A. S. Y. Wong, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 426-434.
8. S. Weigel, R Kallenborn, H. Huhnerfuss *J. Chromatogr. A* 1023(2004) 183-195.

For More Information

For more information on our products and services, visit our Web site at www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent shall not be liable for errors contained herein or for incidental or consequential damages in connection with the furnishing, performance, or use of this material.

Information, descriptions, and specifications in this publication are subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc., 2010
Printed in the USA
January 11, 2010
5990-5001EN

Agilent Technologies

我们的新应用目录还在不断增加。

如需了解更多信息，请访问：
agilent.com/chem/forensics

查找当地的安捷伦客户中心：
agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：
800-820-3278
400-820-3278（手机用户）

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

用于法医鉴定。

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（中国）有限公司，2016
2016 年 3 月 24 日，中国出版
5991-3398CHCN

Agilent Technologies