

使用超临界流体色谱与三重四极杆质谱定量测定药物

应用简报

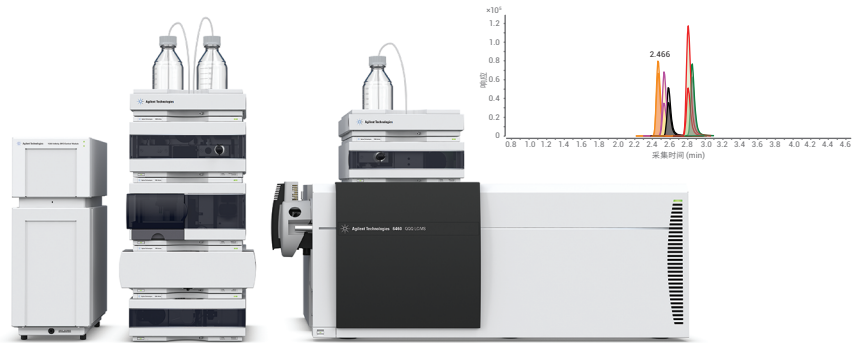
法医毒理学

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与三重四极杆质谱仪相结合，快速分离 25 种药物并实现检测限低至 30 pg/mL 的定量分析。对于所有化合物，校准曲线均表现出优异的线性相关性。对重复测量的统计评估表明，所有 25 种化合物均具有最高的精度和准确度。最后，介绍了对尿液样品中安非他明类化合物的测定。



Agilent Technologies

前言

在法医毒理学的多个应用领域中，对多个法医学目标化合物进行了筛查和定量分析。这些领域包括兴奋剂检测、尸检法医毒理学、药物检测甚至爆炸残留物的测定等等。

药物类别本身在化学性质方面也是多种多样的，这对于分离和检测来说非常重要。化学结构的范围从简单的芳香胺和多环芳香苯二氮卓类到复杂的类吗啡结构，甚至包括四氢大麻酚 (THC) 等疏水化合物。到目前为止，用于一览式定量筛查所有化合物类别的挑战性分离是通过反相 HPLC/MS 完成的¹。

本应用简报介绍了利用超临界流体色谱 (SFC) 在一次定量筛查运行中对不同类别药物的分离。利用 SFC 进行定量筛查可以在几分钟的较短运行时间内完成，与三重四极杆质谱相结合可获得最高的灵敏度。本应用简报中所用的测试集包括安非他明类、苯二氮卓类、吗啡、吗啡类似物和 THC 等

25 种化合物。在绘制校准曲线并进行统计评估后，对加标生物样品进行分析，重点关注安非他明类化合物。在本研究中，对以下目标化合物进行了筛查：

- **安非他明** — 一种中枢神经系统兴奋剂，用途包括被大学生滥用作考试辅助手段²，因为它具有提高成绩的作用^{3,4,5}。然而，较大剂量的安非他明可能会产生严重的副作用，并可能损害认知功能并导致肌肉快速分解⁶
- **甲基苯丙胺** — 也是一种中枢神经兴奋剂。滥用（尤其是吸食透明晶体冰毒）可能导致强烈的副作用，如精神病、偏执、幻觉、横纹肌溶解和脑出血⁷
- **安非他明衍生物** — 3,4-亚甲二氧基苯丙胺 (MDA)、3,4-亚甲二氧基-甲基苯丙胺 (MDMA) 和 3,4-亚甲二氧基-N-乙基苯丙胺 (MDEA) 属于安非他明衍生化

合物。它们属于精神药物。从药理学上讲，它们可用作血清素、去甲肾上腺素和多巴胺释放药物

图 1 给出了化学式。相关化学和毒理学信息可公开获取⁸。

实验部分

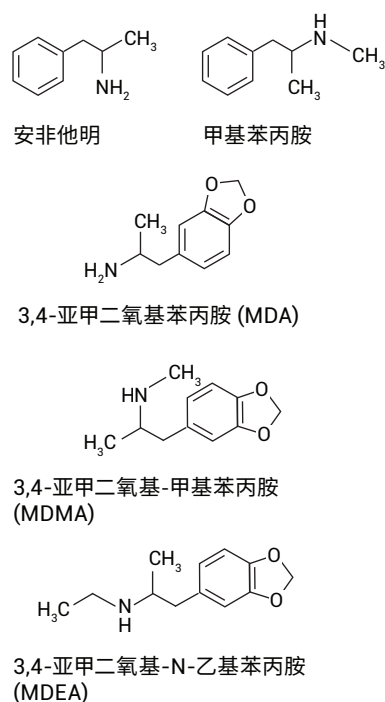


图 1. 本研究使用的安非他明类化合物的化学结构

仪器

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A):

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 标准自动进样器
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器, 配备高压 SFC 流通池
- 采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统 (G6460C)
- Agilent 1260 Infinity 等度泵 (G1310B)
- 安捷伦分流器套装 (G4309-68715)

仪器设置

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的推荐配置在之前的研究中已有描述⁹。

色谱柱

Agilent ZORBAX SB-C8, 4.6 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 828975-906)

软件

- 适用于三重四极杆质谱仪的 Agilent MassHunter 数据采集软件, 07.01 版

- Agilent MassHunter 定性分析软件, 07.00 版
- Agilent MassHunter 定量分析软件, 07.00 版
- Agilent MassHunter MRM 和 Source Optimizer 软件, 07.00 版

通过分流和补偿流将 SFC 连接至 MS:

- 补偿流组成: 甲醇/水 (95/5) + 0.2% 甲酸
- 补偿流流速: 0.3 mL/min

标准品

利用安捷伦 LC/MS 法医毒理学测试混标作为标准储备液。该混合物含浓度为 1.00 μg/mL 的 25 种化合物, 均

以甲醇为溶剂。用甲醇按 1:10 的比例稀释得到用于生成校准曲线的储备液 (100 ng/mL)。

化学品

所有化学品均购自 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)。所有溶剂均为 LC/MS 级。甲醇购自德国 J.T. Baker 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

样品前处理

向尿液样品中加入安捷伦 LC/MS 毒理学测试混标 (100 ng/mL) 中固有的全套化合物, 用甲醇按 1:5 的比例进行稀释, 涡旋混合, 然后在 14000 g 下离心 5 分钟。对上清液进行过滤, 并将滤液直接进样分析。

SFC 方法

参数	描述
SFC 流速	2 mL/min
SFC 梯度	0 分钟 - 2% B, 5 分钟 - 25% B
停止时间	5 分钟
后运行时间	2 分钟
改性剂	甲醇 + 0.2% 甲酸 (FA) + 10 mmol/L 甲酸铵
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	200 bar
柱温	60 °C
进样量	1 μL, 定量环过量填充 3 倍

质谱方法

参数	描述
电离模式	正离子
毛细管电压	3000 V
喷嘴电压	500 V
气体流速	8 L/min
气体温度	220 °C
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	380 °C
雾化器压力	25 psi
MRM 条件	见表 1, 其中显示了母离子、碎片离子、碎裂电压和碰撞能量详细信息。系统在动态 MRM 模式下运行以确保获得最佳灵敏度

结果与讨论

使用 100 ng/mL 的稀释液开发 25 种药物的色谱分离方法。该溶液还用于通过 MRM Optimizer 软件和 Source Optimizer 软件对补偿流、安捷伦喷射流和质谱条件进行优化。

最终 SFC 方法采用 2%–25% 甲醇（含甲酸和甲酸铵）的梯度，在 5 分钟的运行时间内对 25 种化合物进行分离（图 2）。从色谱柱上洗脱下来的第一种化合物是 0.99 分钟洗脱的 THC，最后一种洗脱的化合物是 4.05 分钟洗脱的土的宁。表现出最高强度的化合物是 2.95 分钟洗脱的美沙酮。

利用 100 ng/mL 溶液，并用甲醇按 1:5:2 的稀释模式进行稀释，为固有化合物绘制单独的校准曲线。对所有化合物测量的稀释系列样品的浓度低至 0.01 ng/mL，用于确定各种化合物的定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)。该方法对检测的化合物表现出极高的灵敏度，LOQ 低于 100 pg/mL，LOD 低于 30 pg/mL，且所有化合物均具有良好的线性相关性（表 2）。为进行统计评估，将 10 ng/mL 的校准溶液进样分析 15 次。计算得出的保留时间相对标准偏差 (RSD) 通常低于 0.3%，峰面积 RSD 处于低于 4% 的良好范围内。计算得出的浓度精度低于 3.5%，对应的浓度准确度介于 95% 和 105% 之间。

表 1. MRM 条件：母离子、碎片离子、碎裂电压和碰撞能量（按保留时间排序，见表 2）。由 MRM 方法得到最终 DMRM 方法

化合物	母离子	碎裂电压 (V)	定量离子	CE	定性离子	CE
THC	315.2	150	193.2	20	123.3	30
替马西洋	301.1	117	255.1	29	177	45
氯硝西洋	316.1	110	270	24	214	40
地西洋	285.1	169	193	45	154	25
劳拉西洋	321	102	275	21	194	49
硝西洋	282.1	148	236.1	25	180	41
普罗地芬	354.2	153	167	29	91.1	45
奥沙西洋	287	150	269	12	241	20
可卡因	304.2	138	182.1	17	77	61
维拉帕米	455.3	158	165	37	150	45
曲唑酮	372.2	159	176	25	148	37
羟考酮	316.2	143	298.1	17	256.1	25
哌替啶	248.2	128	220.1	21	174.1	17
MDEA	208.1	107	163	9	105	25
海洛因	370.2	149	268.1	37	165	61
PCP	244.1	86	91	41	86.1	9
安非他明	136.1	66	119.1	5	91	17
MDA	180.1	61	163	5	105	21
甲基苯丙胺	150.1	92	119	5	91	17
MDMA	194.1	97	163	9	105	25
美沙酮	310.2	112	265.1	9	105	29
阿普唑仑	309.1	179	281	25	205	49
可待因	300.2	158	165.1	45	58.1	29
氢可酮	300.2	159	199	29	128	65
土的宁	335.2	195	184	41	156	53

缩写：四氢大麻酚 (THC)，3,4-亚甲二氧基-N-乙基苯丙胺 (MDEA)，苯环己哌啶 (PCP)，3,4-亚甲二氧基苯丙胺 (MDA)，3,4-亚甲二氧基-甲基苯丙胺 (MDMA)

表 2. 25 种药物的保留时间、保留时间 RSD 和峰面积 RSD 以及 10 ng/mL 下的浓度精度和准确度。LOD 和 LOQ, 各种化合物在 100 ng/mL 至 LOQ 浓度范围内的校准曲线的线性

化合物	RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mL)	线性相关系数 R ²	浓度精度 (%)	浓度准确度 (%)
THC	0.997	0.44	4.34	60	200	0.9994	3.78	101.7
替马西洋	1.498	0.44	2.59	40	130	0.9951	2.42	105.5
氯硝西洋	1.642	0.39	2.66	100	300	0.9982	4.25	102.4
地西洋	1.668	0.41	3.81	30	100	0.9997	3.79	101.2
劳拉西洋	1.742	0.32	4.78	300	1000	0.9975	5.15	106.9
硝西洋	1.768	0.37	1.64	20	65	0.9993	3.91	110.9
普罗地芬	1.771	0.27	2.43	15	40	0.9996	1.61	106.9
奥沙西洋	1.862	0.23	2.04	150	500	0.9952	2.15	105.8
可卡因	1.994	0.39	1.42	10	40	0.9998	1.27	98.5
维拉帕米	2.147	0.29	3.09	< 5	10	0.9998	1.99	105.6
曲唑酮	2.370	0.25	4.04	< 5	10	0.9993	3.61	112.1
羟考酮	2.478	0.29	3.65	40	130	0.9951	5.34	105.8
哌替啶	2.494	0.26	4.53	6	20	0.9951	2.42	105.5
MDEA	2.506	0.18	3.48	< 5	10	0.9956	3.31	104.1
海洛因	2.518	0.27	3.53	40	150	0.9983	3.18	106.3
PCP	2.550	0.22	2.73	15	55	0.9991	2.34	110.1
安非他明	2.592	0.17	3.34	20	70	0.9943	2.29	93.1
MDA	2.631	0.16	4.34	60	200	0.9995	2.86	95.2
甲基苯丙胺	2.839	0.15	4.67	< 5	10	0.9983	4.24	105.5
MDMA	2.900	0.16	3.13	10	30	0.9991	2.69	105.6
美沙酮	2.947	0.15	2.86	10	30	0.9998	2.43	102.4
阿普唑仑	3.228	0.13	2.13	10	30	0.9995	2.89	105.8
可待因	3.290	0.19	4.39	20	50	0.9931	3.83	111.8
氯可酮	3.631	0.21	2.91	25	80	0.9931	2.73	112.3
土的宁	4.055	0.13	1.15	50	150	0.9992	1.28	100.3

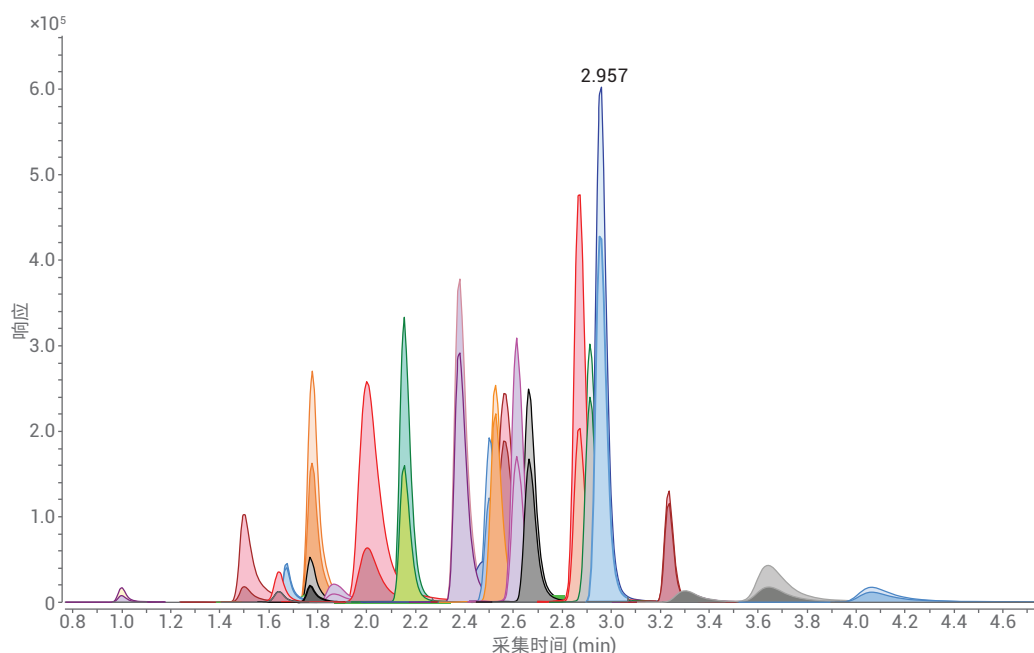


图 2. 用 SFC 分离法在 5 分钟的运行时间内对含 25 种药物的混合物进行分离并用 DMRM 进行检测

作为示例，对加标尿液样品中的安非他明类化合物进行更详细的分析。样品加标浓度为 100 ng/mL，用甲醇按 1:5 的比例进行稀释，得到最终浓度 20 ng/mL，并将其进样分析，如“实验部分”所述。在较短的梯度条件下（甲醇含量在 5 分钟内从 2% 增加至 25%），五种安非他明化合物在 2.4 至 3.1 分钟之间洗脱（图 3）。为进行更精确的评估，将样品进样分析 10 次。由重复进样分析计算得出的保留时间和浓度的 RSD 分别为 0.4% 以下和 3% 以下。浓度准确度处于 82%–101% 的范围内，这对于定量分析来说非常出色（表 3）。

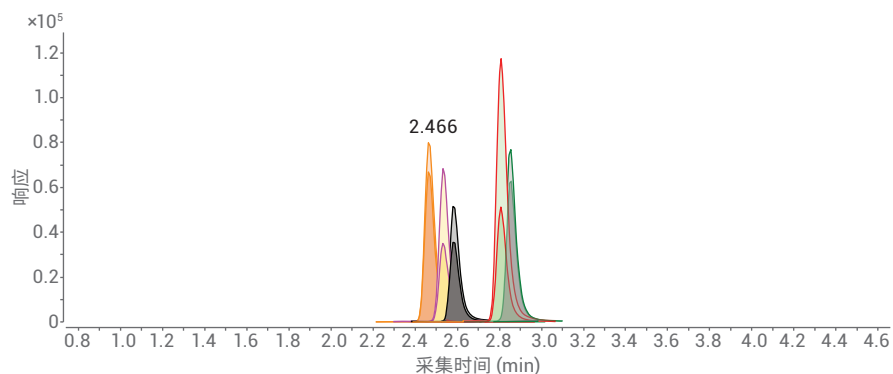


图 3. 加标尿液样品（100 ng/mL，用甲醇按 1:5 的比例稀释）中 20 ng/mL 的安非他明类化合物（安非他明、甲基苯丙胺、MDA、MDMA 和 MDEA）

表 3. 利用 SFC/三重四极杆质谱仪得到的加标和经稀释的尿液样品中安非他明的定量测量结果

化合物	RT (min)	RT RSD (%)	实测浓度 (ng/mL)	浓度精度 RSD (%)	浓度准确度 (%)
MDEA	2.466	0.42	19.61	2.75	97.98
安非他明	2.554	0.42	16.41	3.03	82.05
MDA	2.595	0.37	20.19	1.37	100.95
甲基苯丙胺	2.813	0.21	17.27	1.75	86.35
MDMA	2.860	0.17	17.71	2.16	88.55

作为示例，浓度范围为 0.2 ng/mL 至最高 100 ng/mL 的 MDA 获得的校准曲线表现出高达 0.9995 的优异线性系数。由浓度为 20 ng/mL 的所测样品获得的定量离子和定性离子表现出良好的峰形，它们的比例处于预期范围内（图 4）。

结论

本应用简报介绍了利用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统对大量药物的快速分离。将 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆质谱仪相结合，能够实现快速筛查和定量分析。所有化合物均在较短的 5 分钟梯度条件下得到洗脱和分离，并获得了较高的保留时间和峰面积精度（分别为 0.3% 和 4%）。所有校准曲线均表现出优异的线性，LOD 低于 30 pg/mL，证明可实现高灵敏度分析。浓度精度低于 3.5%，准确度介于 95% 和 105% 之间。通过定量分析加标尿液样品中的安非他明类物质，展示了对法医毒理学样品的分析性能。结果证明，加标化合物的浓度以优异的浓度精度和准确度测得。

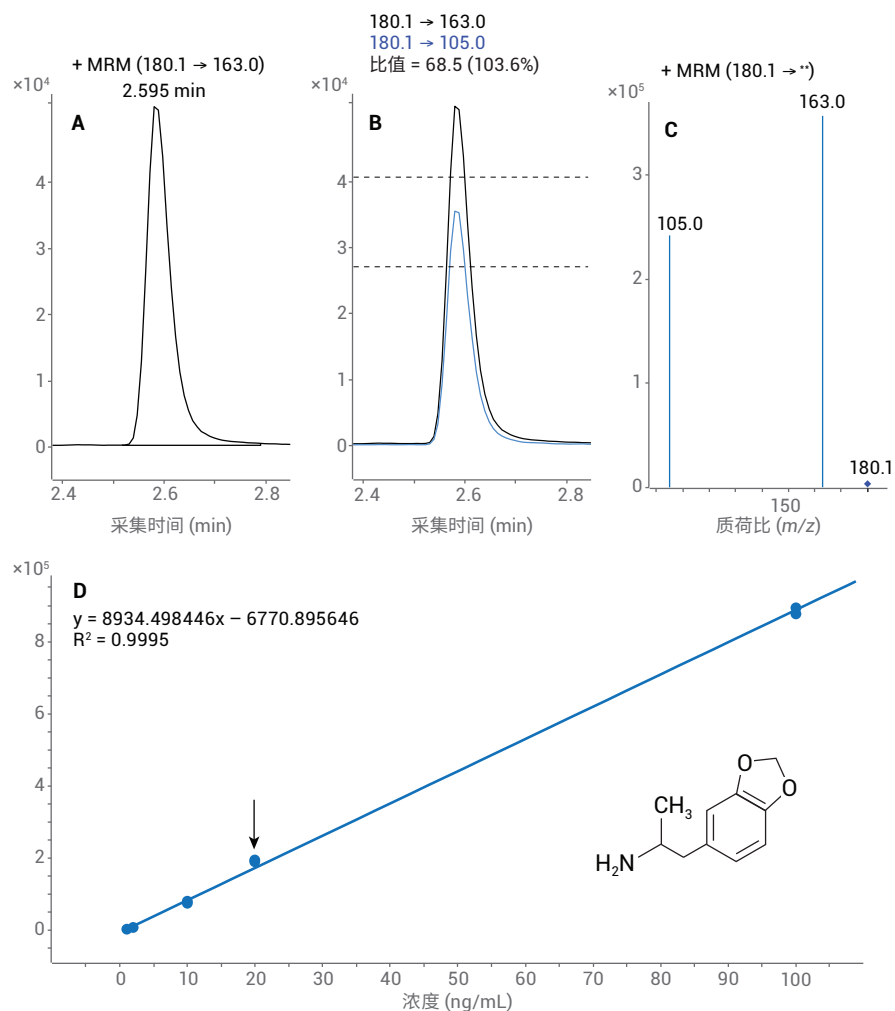


图 4. 加标尿液样品中 MDA 的定性测量。A) 浓度为 20 ng/mL 的 MDA 的定量离子。B) 定量离子、定性离子及其比例。C) MDA 的 MS/MS 谱图。D) MDA 在 0.2 ng/mL 至 100 ng/mL 之间的校准曲线，线性相关系数为 0.9995。实测浓度如箭头所示

参考文献

1. Stone, P. J. W. An Application Kit for the Screening of Samples for Analytes of Forensic and Toxicological Interest using LC/QQQ MS/MS with a Dynamic MRM Transition Database (采用配备动态 MRM 离子对数据库的 LC/MS/MS 筛查样品中法医毒理学目标分析物的应用套装), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-4254EN, **2009**
2. Heal, D. J.; et al. Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. *J. Psychopharmacol.* June **2013**, 27(6), 479–496
3. Malenka, R. C.; Nestler, E. J.; Hyman, S. E. Chapter 13: Higher Cognitive Function and Behavioral Control. In *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*; by Sydor, A.; Brown, R. Y. McGraw-Hill Medical, New York, USA, 2009; 2nd ed., p. 318, 321
4. Wood, S.; et al. Psychostimulants and cognition: a continuum of behavioral and cognitive activation. *Pharmacol. Rev.* **2014**, 66(1), 193–221
5. Twohey, M. Pills become an addictive study aid. *JS Online*, 26 March **2006**, archived from the original on 15 August 2007, retrieved 2 December 2007
6. Westfall, D. P.; Westfall, T. C. Miscellaneous Sympathomimetic Agonists. In *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics* by Brunton, L. L.; Chabner, B. A.; Knollmann, B. C. McGraw-Hill, New York, USA, 2010; 12th ed
7. Rusyniak, D. E. Neurologic manifestations of chronic methamphetamine abuse. *The Psychiatric clinics of North America* **2013**, 36, 2, 261–275
8. www.wikipedia.org (2015 年 12 月访问)
9. Naegele, E., Glauner, T. 使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与三重四极杆质谱检测开发多农药分析方法, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-6151ZHCN, **2015**

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

用于司法鉴定。

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, 2017
2017 年 10 月 15 日, 中国出版
5991-6747ZHCN



Agilent Technologies