

气相色谱质谱联用仪

作者

Timothy D. Ruppel

PerkinElmer, Inc.

Shelton, CT 06484 USA

SAMHSA 制定的尿液
中鸦片GC/MS分析法

简介

美国卫生部（DHHS）及物质滥用和精神健康服务管理局（SAMHSA）制定美国联邦药物测试项目中关于尿液中各种药物测定的强制指南。该强制指南规定，在尿液样品药品测试报告阳性结果之前，需要实验室进行初始药物测定和药物确证两步分析测定。初始药物检测通过免疫分析筛查5个药物类别（如安非他明，鸦片，苯环利定和大麻），免疫筛查法包括放射免疫检测（RIA）及酶免疫检测（EMIT）等。

免疫筛查样品测定结果为阳性需要进一步的色谱分离确证和质谱鉴定。SAMHSA规定可卡因，吗啡的分析方法定量限都约为2000ng/mL，如果吗啡的测定结果超过2000ng/mL，建议测定6-乙酰吗啡，6-乙酰吗啡是典型使用海洛因的降解产物，6-乙酰吗啡的近似限量为10 ng/mL。

确证分析尿液中药物的主要有以下7个步骤:

- 1、在尿液样品中加入氘代内标;
- 2、调节尿液的PH值;
- 3、水解尿液 (仅鸦片和大麻);
- 4、固相萃取 (SFE) 尿液中的药物, 蒸发至干;
- 5、衍生萃取物 (PCP除外), 蒸发至干;
- 6、有机溶剂复溶;
- 7、注入1-3 μ L至气相色谱质谱联用仪, 使用3离子比例的报告鉴定及定量测定。

玻璃器皿

所有的玻璃器皿, 包括自动进样瓶和小体积的进样瓶内插管必须进行硅烷化处理, 以防止样品吸附。将所有的玻璃器皿在10%DMDCS/甲苯溶液中浸泡10min, 依次采用甲醇、正己烷清洗, 然后风干。

试剂

β -葡萄糖醛酸酶

氢氧化钠

浓盐酸

醋酸100mM=2.86mL冰醋酸加入500mL的水中;

磷酸缓冲盐100mM pH6=1.7g Na_2HPO_4 + 12.14 g NaH_2PO_4 加入1000mL水中溶解, pH偏高用100 mM NaH_2PO_4 调节, pH偏低用100 mM Na_2HPO_4 调节。

二氯甲烷/异丙醇/氨水(78:20:2)萃取溶剂=40mL IP-OH+4mL conNH_4OH +156mL MeCl_2 , 每天新配。

药物标准品及氘代内标为Cerillant ((Round Rock, TX), 内标: d3-可卡因, d3-吗啡, d3-6-乙酰吗啡。

仪器设备

气相色谱: PerkinElmer Clarus 680 GC;

进样口: 毛细柱进样口使用压力脉冲无分流进样, 250 $^\circ\text{C}$;

进样口衬管: SiltekTM带有玻璃毛(Cat. No. N6502010);

气相色谱柱: Elite-5 (5%苯基/95%甲基硅烷) 12m \times 0.2mm \times 0.33 μm (Cat. No. N9316110), 载气He流速2.0mL/min;

气相炉温: 100 $^\circ\text{C}$ 开始保持0.5min, 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至310 $^\circ\text{C}$, 保持4min;

压力脉冲无分流进样: 该程序是在进样过程中增加进样口压力, 从而使更多的样品以很窄的带宽进入色谱柱, 然后减少载气的流速至色谱的正常操作线速度。该方法的时间程序设置如下:

在-0.71min, CAR2设置为5mL/min (进样之前增加压力); -0.7min SPL2设置为0 (无分流进样); 0.7 min CAR2设置为2 mL/min (进样后正常流速); 0.8min设置SPL2为50 (进样后, 打开分流阀)。

质谱: PerkinElmer SQ 8 MS, 270 L/sec分子涡轮泵, EI模式。选择离子监测 (SIM) 模式采集数据, 每个离子采集20-30毫秒。主要离子用于鉴定和定量分析, 另外两个离子用于确证及鉴定。

三个离子色谱峰的顶点必须在标准品扫描的保留时间 \pm 2之内, 离子比例与标准品的离子比例相差不超过20%。氘代的内标可以仅选择两个离子, 一个主要离子和一个确证离子。

PFPA SIM离子:	可卡因: 282,445,446	d3-可卡因: 285,448	RT:7.16min
	吗啡: 414, 430, 577	d3-吗啡: 417, 580	RT:7.35min
	6-乙酰吗啡: 414, 361, 473	d3-6-乙酰吗啡: 417,479	
BSTFA SIM离子:	可卡因: 371,234,343	d3-可卡因: 374, 237	
	吗啡: 429, 287, 324	d3-吗啡: 432,290	

固相萃取

采用高分子树脂的固相萃取 (SPE) 柱从尿液基体中萃取药物, 当尿液样品通过树脂柱时, 药物被保留, 清洗树脂柱床除去盐及其它的干扰物。使用较强的溶剂将药物从树脂柱床中淋洗下来, 以完成样品的净化。萃取柱使用 Supra-Clean SPE柱, C18-S 2—mg/3mL 50u (Cat. No. N9306462)。

水解

一些药物必须经过水解以消除葡萄糖醛酸苷键合作用, 该键合作用会降低样品的溶解性能及阻止药物被萃取。样品 SPE萃取以前的预处理通常由酶解或者酸水解实现。两种水解大致步骤如下:

酶解

3-5mL尿液样品及内标物质加入2mL β -葡萄糖醛酸酶混合, 涡旋, 65°C加热3h。冷却, 离心, 移取上层溶液, 用700 μ L1.0NNaOH调节pH为6.0。

酸水解

3-5mL尿液样品及内标物质加入500 μ L浓HCL, 涡旋, 120°C加热30min。冷却, 离心, 移取上层溶液, 加入1mL7.4N NH_4OH 涡旋, 用1-3mL500mM磷酸调节pH为6.0。

试验

萃取程序: 3mL尿液样品+内标, 水解除除葡萄糖醛酸苷键合作用。

SPE柱萃取: 先后用3mL甲醇、3mL水分别淋洗萃取柱, 然后加入1mL pH6 100mM的磷酸缓冲盐。加入样品, 分别使用3mL水, 1mL100mM 的乙酸, 1mL甲醇清洗。使用3mL二氯甲烷/异丙醇/氨水(78:20:2)淋洗萃取柱, 收集萃取溶液可至离心管中。小于50°C蒸发至干, 利用50 μ L的PFPA复溶, 加入25 μ L的PFPOH, N_2 氛围, 盖紧, 混匀, 70°C加热20min, 小于50°C蒸发至干。100 μ L乙酸乙酯复溶, 转移至自动进样瓶的内衬管中, 进样1 μ L。

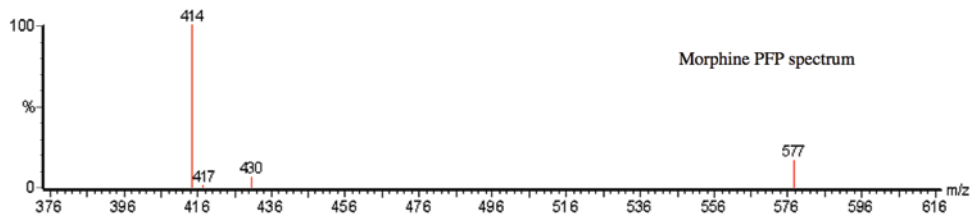
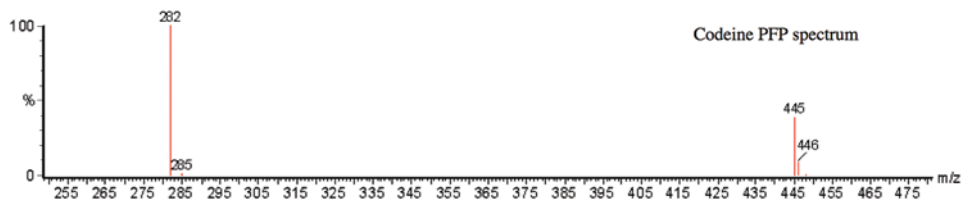
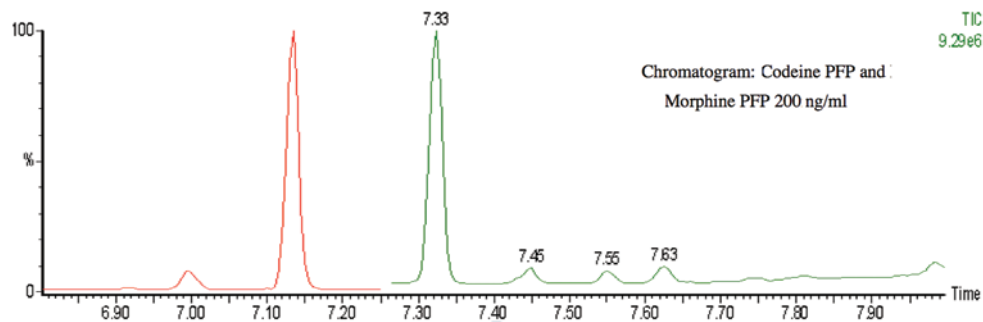
可选择的衍生方法

使用50 μ L复溶蒸发至干的萃取物, 直接加入含有1%TMCS的BSTFA 50 μ L。 N_2 氛围, 盖紧, 混匀, 70°C加热20min。直接加入1 μ LBSTFA溶液。

校准范围:

10% (200 ng/mL) , 40% (800 ng/mL) , 100% (2000ng/mL) , 125% (2500ng/mL) , 500% (10000ng/mL) ,1000% (20000ng/mL) 。

结果

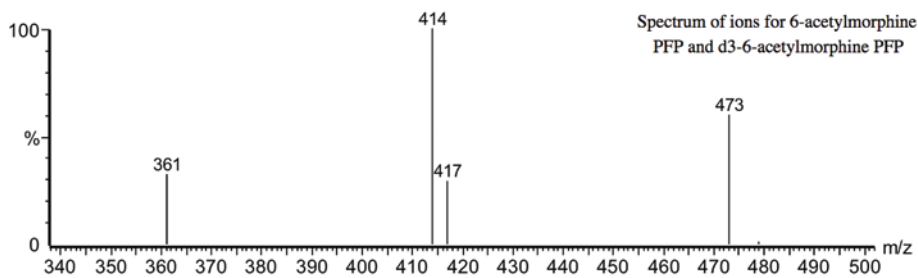
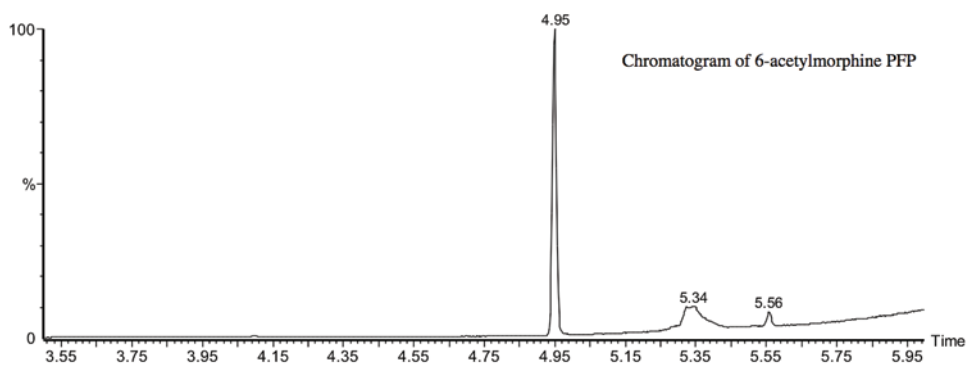


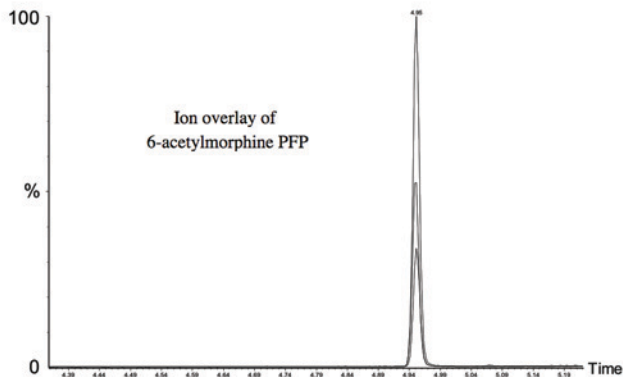
定量限: 1mL尿液20ng/mL

检测限: 1mL尿液小于2ng/mL

线性相关系数 (R^2) >0.999 20 ng/mL-20000 ng/mL

Results for 6-acetylmorphine PFP

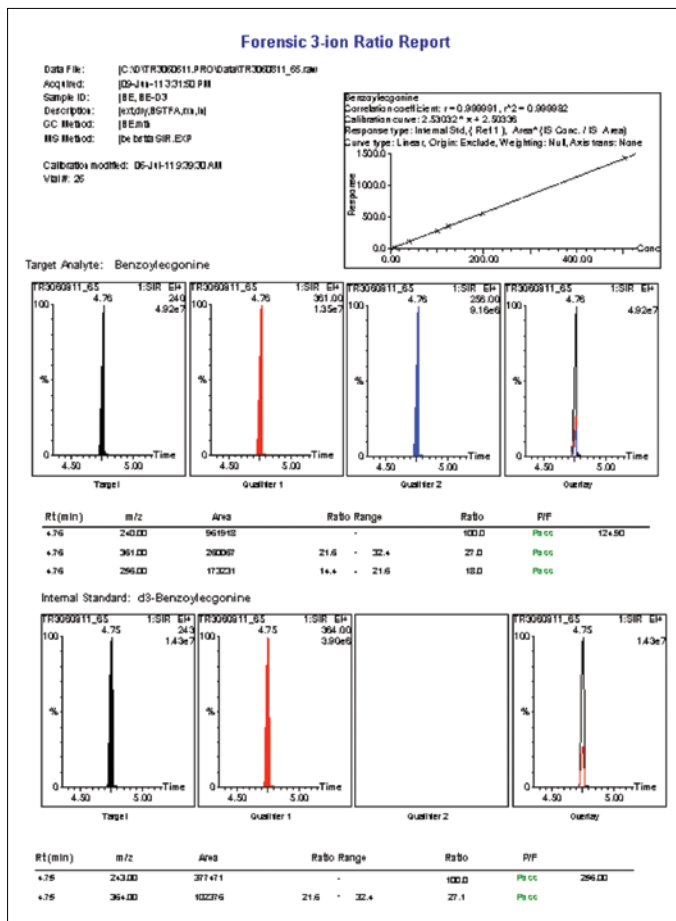




结论

本应用文献建立了GC/MS分析尿液中可卡因和吗啡的方法，检测限 $\leq 20\text{ng/mL}$ ，比美国联邦药物测试项目的限量标准低了10倍。法医和临床实验室可以用同样的方法测定毒理学样本中非限制的药物。通过使用较短的气相色谱柱，较快的流速进入质谱，很快的气相色谱炉降温速度及自动进样器的预清洗程序，从而提高了样品通量。

PerkinElmer公司SQ 8 GC/MS的操作系统在SIM扫描模式时，给出了灵敏的法定可靠色谱数据。TurboMass GC/MS软件包括提供3离子比例数据的报告模板，该模板简单易懂。



参考文献

- Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 8th Ed, Randall C. Baselt, Biomedical Publications, 2008.
- Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs, Fed Reg, 73: 71857 (Nov 25, 2008).
- Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs, Fed Reg, 75: 22809 (April 30, 2010).
- Pierce Catalog (Rockford, IL).

PerkinElmer, Inc.

珀金埃尔默仪器（上海）有限公司
 地址：上海张江高科园区李冰路67弄4号
 邮编：201203
 电话：800 820 5046 或 021-38769510
 传真：021-50791316
www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表，请访问<http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs>

版权所有 ©2012, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自持有者或所有者的财产。