利用 DPX 枪头式分散固相微萃取柱（DPX tips™）萃取及分析唾液中的滥用药物残留

摘要

本文介绍了一种在唾液中检测滥用药物的全自动方法。该方法中使用悬散萃取枪头（DPX）tips 分离并浓缩待分析物，并洗脱于有机溶剂中，随后通过 LC/MS/MS 进行分析而无需蒸发。这种省时省力的方法只需5分钟完成样品萃取，只需 7 分钟进行分析。

本研究检测的滥用药物包括鸦片，THC，安非他明，可卡因及 PCP。LOD 及 LOQ 分别为5 和 10 ng/mL。THC 为单独分析，LOD 为 2 ng/mL，LOQ 为 5 ng/mL。

简介

唾液是临床及毒理实验室常用的样品。唾液检测的难点为检测限低及样品干扰物质多，因此唾液样品的纯化是关键步骤。基于此，本研究目的之一为，建立一种应用 DPX 技术快速纯化唾液中药物的方法，并通过 LC/MS 进行快速分析。另一目的是使所有待测物通过一次纯化即可分离。

应用该方法，我们成功地检测了鸦片，安非他明，可卡因及 PCP，检测浓度为5-10 ng/mL，THC 为 2-5 ng/mL，而无需蒸发步骤。除了 THC，所有待测物均可通过一次纯化而分离（洗脱液为 15%乙腈）。上样 20 µL 乙腈可使检测限小于 5 ng/mL。

关键词

SPE，DPX，滥用药，LC/MS/MS，全自动



图 1. GERSTEL MPS 及 DPX tips。

材料与方法

材料：

药物标准品购于 Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA) 。五种药物及相应的内标为：

1) 鸦片类：吗啡，氧吗啡酮，氢吗啡酮，可待因，氧可酮，氢可酮
2) 安非他明类：安非他明，甲基苯丙胺，MDMA，MDEA，MDA
3) 可卡因及苯甲酰芽子碱
4) PCP
5) THC

使用 Quantisal collection kits (Immunalysis, Pomona, CA)收集志愿者唾液。

DPS tips (WAX-TA-di (20 mg)) 购于 DPX 公司。

方法：

纯化过程在 96 深孔板中进行，自动纯化过程如下：

1. 用 30%甲醇润洗 DPX-WAX tips
2. 吸入 750 L 唾液样品
3. 500 L DI 水洗涤
4. 250 L 15% 乙腈洗脱
5. 250 L 乙腈洗脱（THC）
6. 2 L （或 20 L ）上样。

仪器设备：

GERSTEL 2XL autosampler（图 1），Agilent 6460 LC/MS/MS，Poroshell EC-C18 column (3.0 x 50mm, 2.7 m) ，6 port (0.25mm) Cheminert C2V injection valve。柱子温度为 55℃。LC流动相 A 为 5 mM 甲酸铵，0.05%甲酸；流动相 B 为含有 0.05%甲酸的甲醇。梯度起始位 98%运行 5 分钟，30% 1.5 分钟，70% 3.5 分钟，95% 4.5 分钟，维持 6.4 分钟，回到 98%，流速为 0.5 mL 每分钟。

表 1. MS 分析参数

Compound	Prec Ion	Prod Ion	Frag	CE	Cell Acc	Ret Time
6-monoacetyl	328.2	165.1	158	41	7	1.9
6-monoacetyl	328.2	58.1	158	29	7	1.9
Benzoylecgonine	290.1	168.1	118	17	7	2.38
Benzoylecgonine	290.1	105	118	29	7	2.38
Cocaine	304.2	182.1	138	17	7	2.56
Cocaine	304.2	77	138	61	7	2.56
Codeine	300.2	165.1	158	45	7	1.86
Codeine	300.2	128	158	60	7	1.86
D3-Cocaine	307.1	185.1	138	17	7	2.56
D5-Amphetamine	141.1	124.1	70	5	7	2.1
D5-Amphetamine	141.1	93.1	70	33	7	2.1
d-Amphetamine	136.1	119.1	66	5	7	2.1
d-Amphetamine	136.1	91	66	17	7	2.1
Hydrocodone	300.2	199	159	29	7	1.98
Hydrocodone	300.2	128	159	65	7	1.98
Hydromorphone	286.2	185	159	29	7	1.58
Hydromorphone	286.2	157	159	45	7	1.58
MDA	180.1	163	61	5	7	2.11
MDA	180.1	105	61	21	7	2.11
MDEA	208.1	163	107	9	7	2.26
MDEA	208.1	135	107	21	7	2.26
MDMA	194.1	163	97	9	7	2.13
MDMA	194.1	105	97	25	7	2.13
methamphetamine	150.1	119	92	5	7	2.14
methamphetamine	150.1	91	92	17	7	2.14
Morphine	286.2	165.1	158	41	7	1.43
Morphine	286.2	152	158	60	7	1.43
Morphine-D3	289	165.1	153	40	7	1.43
Morphine-D3	289	152	153	68	7	1.43
Oxycodone	316.2	298.1	143	17	7	1.92
Oxycodone	316.2	241.1	143	29	7	1.92
Oxymorphone	302.1	227.1	133	28	7	1.5
Oxymorphone	302.1	198.1	133	48	7	1.5
PCP	244.2	91	86	41	7	2.98
PCP	244.2	86.1	86	9	7	2.98
PCP-D5	249.3	96.1	97	36	7	2.98
PCP-D5	249.3	86.1	97	8	7	2.98
THC	315.9	193.6	120	20	7	5.35
THC	315.9	123.4	120	30	7	5.35
THC-d3	318.9	196.6	120	20	7	5.35
THC-d3	318.9	123.4	120	40	7	5.35

结果与讨论

唾液样品在检测中有以下四个难点：

1）检测限需要很低（多数药物需要在 10 ng/mL 左右）
2）难易收集大量样品（最多 1 mL）
3）收集时液体被稀释 4 倍 4）唾液中的酶和肽段会干扰分析。

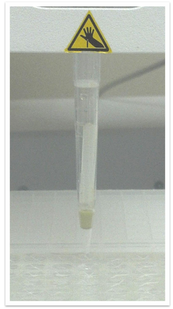


图 2.DPX tips。

基于此，研究人员专注于各种 SPE 方法对唾液样品进行纯化。本研究中，我们使用 DPX 技术进行唾液纯化，悬散的树脂使得回收率及可重复性大大提高。

图 2 为 DPX 纯化过程。有几点值得关注。图中的树脂填料为浅黄色，为蓝色染料脱色所得，这种染料可能是潜在的干扰物质（与唾液中的酶及肽段类似），去除这个干扰后萃取的效率会大大提高。而且，深孔板有封膜，可保证样品和溶液在纯化过程中是干净的。

对于极性药物，如鸦片类及安非他明类，邮寄溶剂不要超过 15%，否则会降低分离效率。幸运的是，我们用 15%乙腈洗脱，其回收率均很高，因此我们用 15%来进行洗脱。表 2 为研究结果。检测限可满足多数实验室要求。

对于 THC 检测，需要 20 µL 上样，乙腈不适合于 THC 的洗脱，且多数的 THC 仍残留在树脂上。尽管如此，我们还是能检测到 2 ng/mL 的 THC（图 3）。图 4 为 THC 的校正曲线，线性范围为 5-10 ng/mL。

未来研究

未来我们会使用更多的样品，多次重复以对该方法进一步进行验证。并将进一步对 MS参数进行优化。对于 THC，我们会专注于改良方法以提高回收率。我们坚信经过改良的方法可检测更多的滥用药物。

表 2. 检测 LOD 和 LOQ

compound	Ret. Time	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
6-MAM	2.01	10	20
amphetamine	2.13	2	5
benzoylecgonine	2.40	5	5
cocaine	2.58	1	10
codeine	2.11	5	10
hydrocodone	1.99	5	10
hydromorphone	1.60	2	10
MDA	2.15	5	10
MDEA	2.28	5	5
MDMA	2.16	2	5
methamphetamine	2.17	1	5
morphine	1.45	2	5
oxycodone	1.94	5	10
oxymorphone	1.53	2	5
PCP	3.00	1	2
THC (20 uL)	5.32	2	5

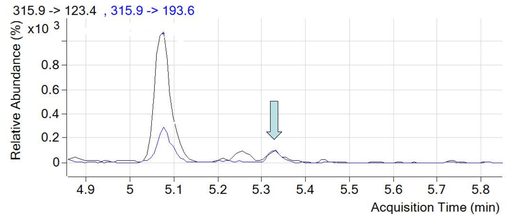


图 3. THC 离子图谱（2 ng/mL）。黑色为 target，蓝色为 qualifier。准确性为 130%。

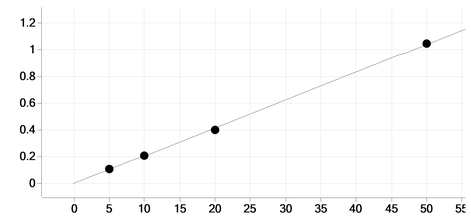


图 4. THC 校正曲线

另外，我们考虑对于极性药物可进行 2 次上样，且同时进行 THC 及其它非极性药物的纯化，如苯二氮卓类，丁丙诺啡，去甲基丁丙诺啡及芬太尼。

结论

本研究使用 DPX tips 及自动化移液器检测并分析了鸦片，可卡因，PCP，安非他明及 THC，浓度约为 10 ng/mL（THC 为 2 ng/mL），且液体蒸发。DPX 技术可从唾液中检测 5 种滥用药物。