
GC/MS analysis of amphetamine in urine with amphetamine-d5(side chain) as an internal standard

Follow this and additional works at: <https://www.jfda-online.com/journal>

Recommended Citation

Wang, P.-Y.; Tai, S.-J.; Huang, B.-C.; Liu, R.H.; and Suen, E.T.-T. (1996) "GC/MS analysis of amphetamine in urine with amphetamine-d5(side chain) as an internal standard," *Journal of Food and Drug Analysis*: Vol. 4 : Iss. 2 , Article 9. Available at: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2994>

This Original Article is brought to you for free and open access by Journal of Food and Drug Analysis. It has been accepted for inclusion in Journal of Food and Drug Analysis by an authorized editor of Journal of Food and Drug Analysis.

以氣相層析質譜方法及氘同位素藥物為內部標準品 應用於定量尿液中安非他命之探討

王博譽 戴世傑 黃炳中 劉瑞厚* 孫慈悌

行政院衛生署藥物食品檢驗局
*美國阿拉巴馬州立大學(伯明罕)

摘 要

本研究係探討以氘同位素安非他命為內部標準品於氣相層析質譜儀分析尿液中安非他命含量之適用性。本計畫所用之安非他命氘同位素藥物為 amphetamine-d₅ 其與原待測藥物 amphetamine-d₀ 經衍生化試劑 trichloroacetic anhydride 衍生化後探討全掃描質譜圖及指定離子碎片監測 (SIM) 圖譜之離子碎片強度是否相互干擾，並以迴歸方式分析其實際應用在定量上之可行性。研究結果顯示，由兩者之全掃描質譜圖來分析，兩者之離子碎片除 m/z 91, 192 外，其他主要離子之相互干擾甚低，其中 amphetamine-d₀ 之 trichloroacetic 衍生物 (TCA-amphetamine-d₀) 適用之離子為 118, 188, 190 及 91；而 amphetamine-d₅ 之 trichloroacetic 衍生物 (TCA-amphetamine-d₅) 適用之離子則為 123 及 196。由選定離子監測質譜圖 (SIM) 來分析，兩者之選定離子碎片相互干擾甚低，其中 TCA-amphetamine-d₀ 適用之離子為 190, 188, 118 及 91，TCA-amphetamine-d₅ 適用之離子為 196, 194 及 123。由其適用之離子中，本研究選用 TCA-amphetamine-d₀ 之離子碎片 190 及 TCA-amphetamine-d₅ 之離子碎片 194 為定量用離子，以選定離子監測質譜中 190 與 194 之相對離子強度比值對標準品 amphetamine-d₀ 之序列濃度 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 ng/mL 進行迴歸分析，於上述濃度範圍內，具有良好的線性關係 (n = 7, SD = 0.03569, 相關係數為 0.9987)。因此以 trichloroacetic anhydride 為衍生化試劑時，amphetamine-d₅ 應可供作氣相層析質譜法分析尿液中安非他命含量時的內部標準品。

關鍵詞：安非他命，氣相層析質譜儀，衍生化試劑。

前 言

藥物濫用已形成當前嚴重之社會問題，為有效防止濫用情形之惡化，使用尿液篩檢以找出吸毒者已成為普遍採用之方式。尿液篩檢一般分成初步檢驗及確認檢驗兩個步驟，初步檢驗主要係採用免疫學方法。由於免疫學方法對於部份藥物可能會產生偽陽性反應，因此初步

檢驗呈陽性之尿液檢體應再進行確認檢驗。而氣相層析質譜 (gas chromatography/mass spectrometry, 以下簡稱 GC/MS) 方法為目前公定之確認檢驗方法⁽¹⁾，用以剔除初步檢驗時之偽陽性反應，並確認所含藥物之成分及含量。因此，所使用 GC/MS 方法之定性及定量是否準確極為重要。

內部標準法為最有效之定量方法之一⁽²⁾，

其中尤以待測藥物之同位素藥物最常被採用⁽³⁾。一般 GC/MS 方法係以檢體及校正標準品中之待測藥物與其同位素藥物之離子強度比進行定量^(4,5)。由於待測藥物及其同位素藥物之化學性質及質譜之斷裂特性雷同，應用同位素藥物於內部標準定量法可避免於前處理中待測藥物與內部標準品之回收率不同所造成之誤差；及個別氣相層析與質譜分析特性不同造成之誤差。如分析過程中有干擾現象而使得待測藥物無法測得，則所加入之同位素藥物亦將不會顯現。分析人員可據以重新分析而不致誤報為陰性結果。

一般待測藥物均有各種同位素藥物，而目前使用於定量之同位素藥物不一⁽⁶⁾，亦無一定之標準。基本上，採用何種同位素藥物應考量其質量差異、同位素純度及質譜之斷裂特性。因此，同位素藥物須標有足夠量之同位素，使得待測藥物及同位素藥物具有足夠之質量差異。若其質量差異不足，則待測藥物中自然存在之同位素所產生之離子 [M+n] 將影響同位素藥物之離子強度。正常情況下，採用氘同位素 (deuterium) 時，其待測藥物及同位素藥物之質量差異至少為三。同位素藥物應具有足夠之純度，否則，添加高濃度內部標準品有可能在原為陰性檢體中出現少量待測藥物⁽⁷⁾。待測藥物及同位素藥物依循相同之分裂步驟後所選用供作定量之待測藥物離子碎片中，應不含有同位素藥物同質量之離子斷裂碎片。如此同位素藥物才不致干擾尿液檢體中待測藥物之定量。同理，選用供作定量之同位素藥物質譜離子碎片中，亦不可含待測藥物同質量之質譜離子斷裂碎片。並非所有同位素藥物之質譜離子均適於定量，最常見之問題是待測藥物中所產生質譜離子之質量與同位素藥物所產生質譜離子之質量相同，以致彼此相互干擾。

本研究係以安非他命 (amphetamine) 為例，利用安非他命之氘同位素藥物 amphetamine-d₅ 為內部標準品，以衍生化試劑 trichloroacetic anhydride (TCAA)⁽⁶⁾ 作衍生化反應，進行尿液中安非他命定量方法之評估。有關安非他命、內部標準品及衍生化試劑之結構式如圖一所示。我們研究並比較所收集到氘同位素藥物與待測物之質譜圖，選擇適合用來定量的離子碎片。最後以適用之離子碎片做迴歸分析離子強度與濃度的關係，以評估該氘同位素藥物為內部標準品於待測藥物定量時之適用

性。

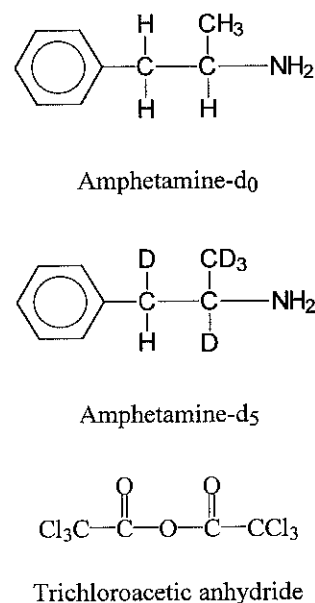


Figure 1. Structure information of amphetamine-d₀, amphetamine-d₅ and trichloroacetic anhydride.

材料與方法

一、儀器與材料

本研究所使用之氣相層析質譜儀係 HP 5890 series II gas chromatograph 及 HP 5970 MSD。操作條件為：注射器溫度 250 °C；管柱初始溫度 100 °C；升溫速率 15 °C/min；最終溫度 250 °C；偵測器溫度 250 °C；攜帶氣體 He (1.0 mL/min.)；注射量 1 μL；介面為分離式 (open-split)；注射模式為無分流式 (splitless)。氣相層析管柱為 HP Ultra II 微細管 (25 m × 0.2 mm × 0.33 μm)。標準品 d,l-amphetamine 及 d,l-amphetamine-d₅(side chain) 係 Radian 公司 (Austin, Texas, USA) 產品。TCAA 及 4-dimethylaminopyridine 係 Fluka 公司 (Buchs, Sweden) 產品，25 % ammonia 水溶液，1-chlorobutane, ethyl acetate, methanol, potassium hydrogen phosphate, potassium hydroxide, sodium carbonate, sodium hydrogen carbonate 及 sodium hydroxide 係 Riedel-de Haen 公司 (Seelze, Germany) 產品。固相萃取管 CLEAN SCREEN CSDAU203 係 World Monitoring 公司 (Bristol, Pennsylvania, USA) 產品。

二、標準溶液之配製

取 amphetamine 標準品 0.2 mL，以尿液稀釋至 100 mL，配製成 2000 ng/mL 之標準原液，再以尿液分別稀釋配製成 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 ng/mL 之標準尿液。取 amphetamine- d_5 1 mg/mL 之標準品 500 μ L，以 methanol 稀釋至 10 mL，配成 5 μ g/mL，供作同位素藥物標準溶液。

三、試劑之配製

量取冰醋酸 6 mL 置於 100 mL 容量瓶中，加入蒸餾水至定容配成 1.0 M 醋酸溶液。量取 25 % 氨水溶液 2 mL 置於 100 mL 容量瓶中，加入 ethyl acetate 配製成定容 2 % ammonium hydroxide 之 ethyl acetate 溶液。稱取 sodium carbonate (Na_2CO_3) 16 g 及 sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) 18 g，置於 250 mL 容量瓶中，加入約 200 mL 蒸餾水。振搖至溶解均勻，再加入蒸餾水至定容配成 1.5 M carbonate buffer (pH 9.5)。稱取 4-dimethylaminopyridine 10 mg，置於 100 mL 容量瓶中，加入 acetone 至定容配成 4-dimethylaminopyridine (0.1 mg/mL) 溶液。稱取 potassium hydroxide 5.61 g 置於 100 mL 容量瓶中，加入約 80 mL 之蒸餾水。振搖至溶解均勻，待回至室溫後加入蒸餾水至定容配成 1 N potassium hydroxide 溶液。稱取 potassium hydrogen phosphate 7.56 g，置於 500 mL 容量瓶中，加入約 400 mL 之蒸餾水。振搖至溶解均勻，以 1.0 M potassium hydroxide 調整 pH 值至 6.0，加入蒸餾水至定容配成 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0)。稱取 sodium hydroxide 4 g，置於 100 mL 容量瓶中，加入約 80 mL 之蒸餾水。振搖至溶解均勻，待回至室溫後加入蒸餾水至定容配成 1 N sodium hydroxide 溶液。

四、全掃描質譜圖及指定離子碎片監測 (SIM) 分析

量取安非他命標準溶液及其同位素藥物標準溶液各 2 mL，分別置於 5 mL 反應瓶中。於室溫以氮氣吹乾後，加入 1-chlorobutane 2 mL，振搖 30 秒使之溶解，再加入 4-dimethylaminopyridine 溶液 150 μ L 及 TCAA 75 μ L，振搖 30 秒，將反應瓶置於 55°C 加熱至隔夜。待回至室溫後分別加入 H_2O 1 mL，1.5 M car-

bonate buffer 0.5 mL 及 1 N NaOH 0.4 mL。振搖 30 秒後，將反應瓶以 1000~1500 rpm 離心 5 分鐘。將有機層移至另一反應瓶中，於室溫以氮氣吹乾保存。各樣品於進行 GC/MS 分析前分別加入 50 μ L ethyl acetate 後，振搖至溶解均勻。衍生化後之安非他命標準溶液及其同位素藥物標準溶液分別進行全掃描質譜分析。根據兩者之全掃描質譜圖，分別找出相對離子強度 (relative ion intensity) 大於 20 % 之離子碎片，並計算兩者離子碎片之相互干擾程度。經全掃描質譜所篩選出之合適離子碎片是否確實可用，係以衍生化後之安非他命標準溶液及其同位素藥物標準溶液進行選定離子監測分析判定。選定離子監測所得到的離子強度可做為計算兩者之選定離子碎片之相互干擾程度。

五、定量迴歸分析

分別於七支 15 mL 試管中加入 0.1 M phosphate buffer 2 mL。分別量取濃度 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 ng/mL 之安非他命標準尿液 5 mL 置於上述試管中，各管並加入同位素藥物標準品溶液 50 μ L。將七支固相萃取管裝置於萃取真空儀上，分別以 methanol 2 mL 及 0.1 M phosphate buffer 2 mL 平衡固相萃取管後，將上述配製好之標準尿液溶液分別通過固相萃取管。繼之以 1.0 M acetic acid 1 mL 通過固相萃取管，並以 15 in. Hg 之真空壓力抽乾固相萃取管 5 分鐘。再以 methanol 6 mL 通過固相萃取管後，以 15 in. Hg 之真空壓力抽乾固相萃取管 2 分鐘。另以七支 15 mL 乾淨試管裝置於萃取真空儀中，分別以 2 % ammonium hydroxide solution 2 mL 沖提固相萃取管，各試管中之沖提液以氮氣吹乾，再加入 0.1 N sodium hydroxide 1 mL 及 1-chlorobutane 2 mL。將上述混合液振搖後離心，取上層有機層置於反應瓶中。分別加入 4-dimethylaminopyridine 溶液 150 μ L 及 TCA 75 μ L。振搖 30 秒後，將反應瓶置於 55°C 加熱至隔夜。待回至室溫後分別加入 H_2O 1 mL，1.5 M carbonate buffer 0.5 mL 及 1 N NaOH 0.4 mL。振搖 30 秒後，將反應瓶以 1000~1500 rpm 離心 5 分鐘。將有機層移至另一反應瓶中，於室溫以氮氣吹乾保存。進行 GC/MS 分析前再加入 ethyl acetate 50 μ L 並振搖溶解均勻。將衍生化後之各濃度安非他命標準尿液，以 SIM 模式進行 GC/MS 分析，選定安非他命及其氫同位

素藥物之離子碎片各乙個，以安非他命離子強度與氘同位素藥物離子強度比值對安非他命濃度進行線性迴歸分析。

結果與討論

一般而言，以 GC/MS 方法分析時，若氘同位素藥物產生之離子與待測藥物產生之離子不致相互干擾，該氘同位素藥物方可供作 GC/MS 方法之內部標準品。我們可同時監測待測藥物及其氘同位素藥物衍生物之質譜資料，測定各主要離子碎片之相對離子強度，以初步瞭解彼此之干擾程度。首先我們由待測藥物之質譜資料中，比較待測物所斷裂之離子碎片及氘同位素藥物所斷裂之對等離子碎片之相對離子強度，即可知氘同位素藥物對待測藥物之干擾程度；同理，我們由氘同位素藥物之質譜資料中，比較氘同位素藥物所斷裂之離子碎片及待測藥物所斷裂對等離子碎片之相對離子強度，即可知待測藥物對氘同位素藥物之干擾程度。假設兩者之干擾程度（即強度比）不大於

3%者，我們便可選定供定量用之離子碎片。

經由上述分析安非他命及其氘同位素藥物之衍生物全掃描質譜圖及選定離子監測質譜資料，找出適用於定性及定量之離子碎片後，即由待測藥物中找出三個不受其氘同位素藥物干擾之離子碎片，再從氘同位素藥物中找出二個不受待測藥物干擾之離子碎片，分別由其全掃描質譜圖及選定離子監測質譜資料中得知其相對離子強度，做為鑑別及定量尿液中安非他命之依據。

安非他命 (amphetamine-d₀) 及其氘同位素藥物 amphetamine-d₅ 之 TCAA 衍生物 (TCA-amphetamine-d₀ 及 TCA-amphetamine-d₅) 之全掃描質譜圖及結構裂解式詳如圖二及圖三，其相對離子強度詳如表一。由表一顯示 TCA-amphetamine-d₅ 於 m/z 118, 188, 190, 91 之相對離子強度均為 0.0 %，因此對 TCA-amphetamine-d₀ 所斷裂之該等碎片，均不致造成干擾，而 TCA-amphetamine-d₀ 之 m/z 192 離子因受 TCA-amphetamine-d₅ 之嚴重干擾

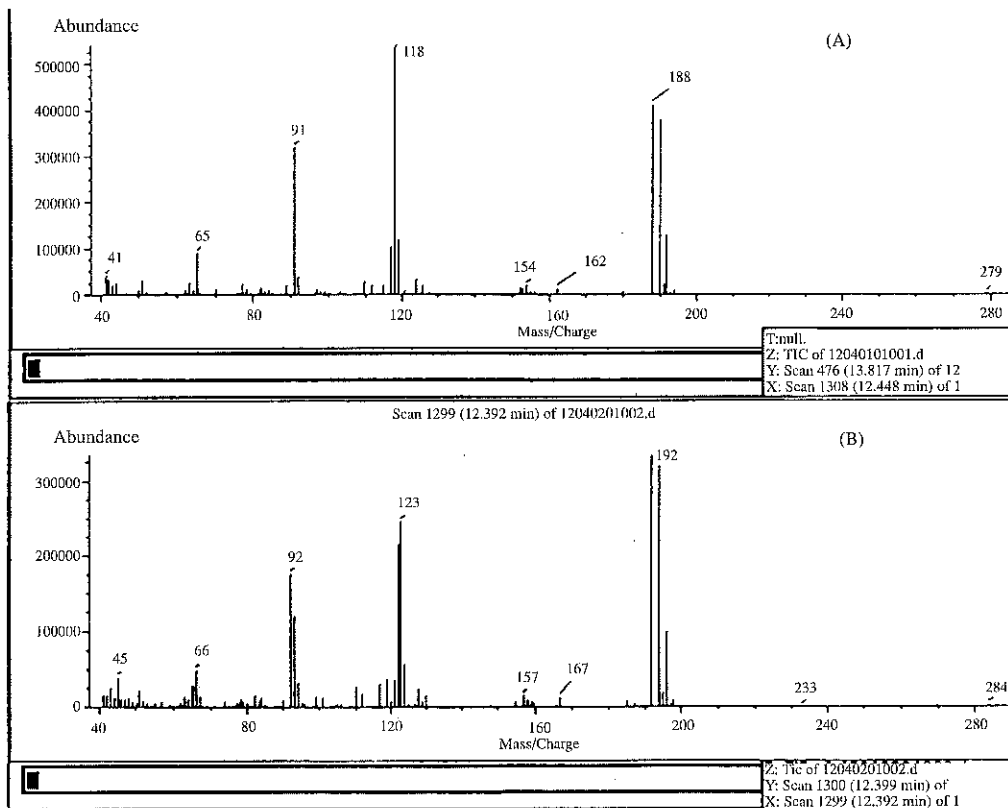


Figure 2. Mass spectrum of TCA-amphetamine-d₀(A), and TCA-amphetamine-d₅(B).

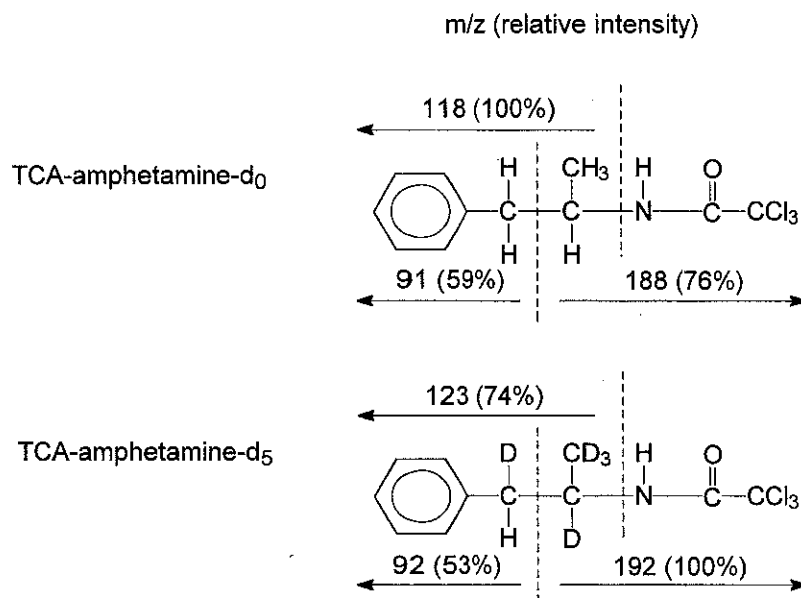


Figure 3. Structure information and ion fragmentation data of trichloroacetyl derivatives of amphetamine-d₀ and amphetamine-d₅.

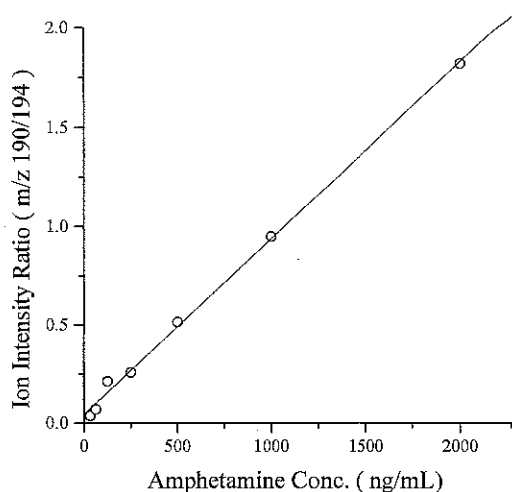


Figure 4. First order fit of amphetamine calibration data.

(100%)，不合採用。同理 TCA-amphetamine-d₅ 之 m/z 192, 92 受 TCA-amphetamine-d₀ 之干擾，因此不適合作為定性及定量用離子。另一方面，TCA-amphetamine-d₀ 對 TCA-amphetamine-d₅ 所斷裂之碎片 m/z 123, 196 不致造成干擾，對 m/z 194 造成之干擾甚低。因此，由兩者之全掃描質譜圖來分析，amphetamine-d₅ 似可供作安非他命以氣相層析質譜法及以 TCAA 衍生化定量時之內部標準品。其中 TCA-

amphetamine-d₀ 適用之離子為 118, 188, 190 及 91；而 TCA-amphetamine-d₅ 最適用之離子為 123 及 196。

安非他命及其氘同位素藥物 amphetamine-d₅ 衍生物之選定離子監測質譜之相對離子強度詳如表二。我們可由表中之資料分析其所斷裂之離子碎片是否有相互干擾之情形。其中 TCA-amphetamine-d₀ 之選定離子監測質譜資料中，m/z 118, 188, 190 及 91 碎片受到 TCA-amphetamine-d₅ 之干擾情形分別為 1.1%, 0.2%, 0.1% 及 2.1%，而 TCA-amphetamine-d₅ m/z 123, 194 及 196 之碎片受 TCA-amphetamine-d₀ 之干擾情形分別為 0.9%, 2.4% 及 0.4%，兩者之相互干擾甚低。因此，amphetamine-d₅ 應可供作安非他命以氣相層析質譜法及以 TCAA 衍生化定量時之內部標準品，其中 TCA-amphetamine-d₀ 適用之離子為 118, 188, 190 及 191，TCA-amphetamine-d₅ 適用之離子為 123, 194 及 196。

由這些資料看來，m/z 118/123 及 190/194 兩對離子源由於 amphetamine/amphetamine-d₅ 的相互干擾程度不大且類似，二者均可用來做為定性與定量之選定離子監測。

接著我們以安非他命標準尿液之濃度，對 TCA-amphetamine-d₀ 之離子碎片 190 與 TCA-amphetamine-d₅ 之離子碎片 194 比值做迴歸分

Table 1. Full-scan mass spectral data of TCA-amphetamine and TCA-amphetamine-d₅

Ion(m/z)	TCA-amphetamine-d ₀	TCA-amphetamine-d ₅
	Relative intensity	Relative intensity
Ions designated for TCA-amphetamine-d ₀		
192	23.7%	100.0%
190	70.5%	0.0%
188	76.3%	0.0%
118	100.0%	0.0%
91	59.3%	0.0%
Ions designated for TCA-amphetamine-d ₅		
196	0.0%	29.5%
194	2.1%	98.1%
192	23.7%	100.0%
123	0.0%	73.6%
92	7.3%	52.8%

Table 2. SIM mass spectral data of TCA-amphetamine and TCA-amphetamine-d₅

Ion(m/z)	TCA-amphetamine-d ₀	TCA-amphetamine-d ₅
	Intensity and % contribution by analog	Intensity and % contribution by analog
Ions designated for TCA-amphetamine-d ₀		
192	70944(308.7%)	219008
190	235648(0.1%)	303
188	229312(0.2%)	382
118	319168(1.1%)	3534
91	205760(2.1%)	4475
Ions designated for TCA-amphetamine-d ₅		
196	309	73288(0.4%)
194	5674	235648(2.4%)
192	70944	219008(32.4%)
123	1178	133056(0.9%)
92	25912	75512(34.3%)

析 (圖四) 在 31.25~2000 ng/mL 可得到良好的線性關係 ($y = 8.9365 \cdot 10^{-4}x + 0.04469$, $n = 7$, $SD = 0.03569$, 相關係數 = 0.9987), 顯示 amphetamine-d₅ 適合於尿液安非他命以 TCAA 衍生化並以氣相層析質譜法定量分析時之內部標準品。

誌 謝

本研究之經費接受行政院國家科學委員會 NSC 83-0412-B-043A-002 之資助, 特此誌謝。

參考文獻

1. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs, Notice. 1994. Federal Register. 59(110) : 29908-29931.
2. Chamberlain, J. 1985. Analysis of Drugs in Biological Fluids. pp.153-155. CRC Press, Boca Raton, FL. U.S.A.
3. Millard, B. J. 1979. Quantitative Mass Spectrometry. pp.135-149. Heyden, Philadelphia. PA. U.S.A.
4. Liu, R. H. 1987. Mass Spectrometry of Commonly Abused Drugs; Yinon JY (Ed) : Forensic Mass Spectrometry. pp.36-37. CRC Press, Boca Raton, FL. U.S.A.
5. Klein, M. 1987. Mass Spectrometry of Drugs and Toxic Substances in Body Fluids. In Yinon JY (Ed) : Forensic Mass Spectrometry. pp.53-55. CRC Press, Boca Raton, FL. U.S.A.
6. Hornbeck, C. L. and Czarny, R. J. 1989. Quantitation of Methamphetamine and Amphetamine in Urine by Capillary GC/MS. Part I. Advantages of Trichloroacetyl Derivatization, J. Anal. Toxicol. 13 : 144-149.
7. Liu, R. H. , Baugh, L. D. , Allen, E. E. , Salud, S. C. , Fentress, J. G. , Chadha, H. , Amrik, A. S. 1989. Isotopic Analogue as the Internal Standard for Quantitative Determination of Benzoylcegonine : Concerns with Isotopic Purity and Concentration Level, J. Forensic Sci. 34: 986.

GC/MS Analysis of Amphetamine in Urine with Amphetamine-d₅(side chain) as an Internal Standard

POR-YUH WANG, SHYH-JYE TAI, BIN-CHUNG HUANG,
RAY (JUEI) H. LIU* AND ERICK TSI-TEE SUEN

*National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan
University of Alabama at Birmingham, U.S.A.

ABSTRACT

This study examined the accessibility of using amphetamine-d₅ (side chain) as an internal standard in quantitative analysis of the trichloroacetyl derivative of urinary amphetamine by gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS). In GC/MS analysis, fragments with minimal interference between the assay protocol and the internal standard were selected for quantitation. In the full-scan mode, no interference from TCA-amphetamine-d₅, the trichloroacetyl derivative of amphetamine-d₅, was observed for the fragments of trichloroacetylamphetamine (TCA-amphetamine) with m/z 190, 188, 118 and 91. On the other hand, no interference from TCA-amphetamine was indicated in fragments of m/z 196 and 123 of TCA-amphetamine-d₅. In the

selective ion monitoring mode (SIM), the interference between m/z 190, 188, 118 and 91 of TCA-amphetamine and m/z 196, 194 and 123 of TCA-amphetamine-d₅ was minimal. The fragments of m/z 190 from TCA-amphetamine and m/z 194 from TCA-amphetamine-d₅ were thus selected for quantitation of urinary amphetamine by SIM. Calibration graph derived from the ratio of relative intensity of m/z 190 to m/z 194 versus the concentration of urinary amphetamine was linear over the concentration range of 31.25 - 2000 ng/mL (n=7, SD=0.0357, r=0.9987). Amphetamine-d₅ was demonstrated to be a suitable internal standard in quantitative analysis of the trichloroacetyl derived urinary amphetamine by SIM analysis with GC/MS.

Key words : Amphetamine, GC/MS, derivative.