

GC/MS/MS 法在头发中毒品及代谢物的 筛选分析中的应用

沈 敏, 沈保华, 向 平

(司法部司法鉴定科学技术研究所 上海 200063)

摘要:本文建立了头发中常见滥用药物的 GC/MS/MS 筛选分析体系。结果表明 MS/MS 技术通过选择性地采集特定的母离子而避免了基质的干扰, 具有质谱 SIS 的高灵敏度特征和 scan 提供结构信息的功能。方法回收率为 68~101%, 最低检出限为 0.01~2 ng/mg。

关键词:毒品及代谢物; 筛选分析; 头发分析; GC/MS/MS

中图分类号:R114;O657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2002)01-0011-06

头发毒品分析的证据作用是其能确认检查对象在长周期内是否摄毒及摄毒程度, 因而在摄毒鉴定中具有广泛的应用价值。为了适应未知毒品分析和多种毒品分析的需要, 建立头发中常见毒品及代谢物的系统筛选体系, 是毒物分析工作者所面临的又一重要任务。

头发中毒品分析的基本特点是: (1) 头发中毒品或代谢物含量甚微, 一般为 ng/mg 水平, 必须通过衍生化以提高灵敏度或改善色谱行为; (2) 头发有较多的内源性杂质, 经衍生化后产生较高的背景干扰。这种特殊生物检材要求检测体系必须同时具备高灵敏度和高特征性。对于头发中单类滥用药物的分析, 国外已有大量的文献报导, 但对头发系统毒品分析, 即头发经一次提取和分析, 可同时鉴别多类滥用药物的研究极为罕见。仅有法国 Gaillard^[1] HPLC/二极管阵列检测器和 GC/MS 筛选、鉴别头发中碱性、酸性、中性药物; 英国 Pasterson^[2] 等报导用 GC/MS 的选择离子方式 (SIM), 同时筛选分析毛发中鸦片、可卡因、苯丙胺、美沙酮、苯二氮卓类等; Goldberger^[3] 报导建立了滥用药物的广谱分析体系。

上述方法为了使筛选分析具有足够的灵敏度, 大多采用 SIM 技术, 即在提高灵敏度的同时, 牺牲了质谱提供分子结构信息的功能。

本研究在以往头发单类毒品分析的基础上^[4~5], 通过时间编程 GC/MS/MS 技术, 建立了头发中海洛因、度冷丁、可待因、美沙酮、可卡因、违禁苯丙胺类等 13 种常见毒品及代谢物的系统筛选分析体系, 比较离子阱质谱的一级质谱 (GC/MS)、二级质谱 (GC/MS/MS) 和离子存储技术 (SIS), 发现 GC/MS/MS 技术在低目标物浓度、高基质背景的情况下, 具有特殊的消除背景干扰。改善检测限的优越性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

标准品: AMP、MAMP、MDA、MDMA、度冷丁、去甲度冷丁、EDDP、美沙酮、可卡因、苯甲酰芽子碱、可待因、吗啡、单乙酰吗啡, Sigma 公司和国家麻醉品实验室提供。

衍生化试剂: N-methyl-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA), Sigma 公司提供。

收稿日期: 2002-03-04; 修回日期: 2002-03-07

作者简介: 沈敏 (1955~), 女 (汉族), 浙江慈溪人, 研究员, 毒物分析专业

其它试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器条件

CP3800/SATURN2000GC/MS 仪

色谱条件:DB-5 毛细管柱(30 m×0.25 mmI. D., 0.33 μm 膜厚),初温 100 °C,10 °C/min 程序升温至 150 °C,然后以 25 °C/min 升温至 280 °C,保持 10 min。

质谱条件:离子阱温度:150 °C;Manifold 温度:45 °C;传输线温度:250 °C。

以一级质谱分析结果为基础,选择各药物的分子离子或特征离子为母离子,利用自动方法开发(AMD)软件,确定各药物的最佳电离方式(共振或非共振)、碰撞电压(CID)和离子存储水平(RF)。13 种常见毒品及代谢物的 MS/MS 条件及子离子见表 1。

表 1 13 种常见毒品及代谢物的 MS/MS 条件

RT	药物	母离子	CID 电压	RF 值	子离子
5.2	AMP-TMS	116	0.4	50	73
5.8	MAMP-TMS	130	0.5	57	73
7.1	MDA-TMS	116	0.4	50	73
7.5	MDMA-TMS	130	0.5	57	73
7.7	度冷丁	247	0.35	60	172,218(10)
8.2	去甲度冷丁-TMS	304	0.45	67	230,290(40)
8.8	EDDP	277	0.7	48	263,248(40)
9.2	美沙酮	310	0.65	40	265
9.5	可卡因	303	0.4	67	182
9.6	苯甲酰芽子碱-TMS	361	0.5	80	240
10.6	可待因-TMS	371	34(非共振)	60	234,343(65)
10.8	吗啡-diTMS	429	0.8	60	414
11.3	单乙酰吗啡-TMS	341	0.65	60	324

1.3 头发处理

头发样品分别用 0.1%十二烷基硫酸钠(SDS),0.1%洗洁净,丙酮振荡洗涤一次。晾干后剪成 2~3 mm 长度,保存供检。

称取毛发样品 10 mg,加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL,在 45 °C 水浴上保温过液,冷却后调 pH 值约为 9,用乙酸乙酯混旋提取,离心。提取液转移至另一离心管中,加 1 滴 2%酸性甲醇,于 45 °C 下氮气吹干,用 MSTFA 微波衍行化后供检。

2 结果与讨论

2.1 头发样品处理

头发样品处理通常有酸水解法、碱水解法、酶水解法和甲醇超声法。碱水解可使头发溶解,因而固化在角蛋白中的毒品及代谢物药物释放完全,但水解条件过于激烈,不适合单乙酰吗啡

等不稳定化合物的提取处理;酶水解条件温和,缺点是成本昂贵;甲醇超声虽适用范围较广,但药物释放不完全且提取物杂质较多,需进一步净化处理。本研究经比较、优化,最后选择了条件较为温和,适用范围较广的酸水解法。水解产物分别用乙醚、乙酸乙酯、氯仿:异丙醇(9:1)提取,结果表明乙醚难以提取极性较大的或需强碱性提取的化合物;氯仿与异丙醇混合液虽提取回收率较高,但同时提出物杂质干扰也较大,如表 2 所示,综合考虑提取溶剂以乙酸乙酯为佳。

与体液相比,毛发中滥用药物含量较低,一般均需衍生化。MSTFA 和 BSTFA 属同一类衍生化试剂,理论上均可和毒品及代谢物中的羟基、羧基、氨基反应,但研究发现,MSTFA 反应活性高于 BSTFA,使用 MSTFA 衍生化试剂,可获得较佳的衍生化效果。此外,也可使用 TFA 和 BSTFA 双衍生化法^[6]。

表 2 毛发中常见毒品及代谢物的提取效率(n=3)

药物	回收率(%)		
	乙醚	乙酸乙酯	氯仿:异丙醇
AMP	30.1	77.2	79.7
MAMP	60.8	79.7	92.2
MDA	44.8	100.8	96.4
MDMA	58.8	94.4	101.8
度冷丁	94.0	101.8	99.3
去甲度冷丁	74.5	79.1	84.9
EDDP	35.2	73.3	75.0
美沙酮	87.2	103.3	100.2
可卡因	90.4	99.8	87.8
苯甲酰芽子碱	35.9	68.7	78.3
可待因	23.5	69.4	83.7
吗啡	13.5	73.2	84.0
单乙酰吗啡	24.3	87.7	92.1

2.2 GC/MS/MS 分析条件的选择

Saturn2000 的 MS/MS 分析采用时间串联方式,其基本步骤包括:(1)电离被分析物,使其产生碎片离子;(2)从碎片中筛选并存储母离子;(3)激化母离子使其产生子离子;(5)收集子离子质谱。根据离子阱质谱的工作原理,以各组份的保留时间区域为一时间段,将选定的各毒品及代谢的母离子质量(m/z)、解离方式(共振、非共振)和碰撞电压(CID)、离子存储水平(RF)进行时间编程,实现一次色谱过程可同时筛选分析常见毒品及代谢物的目的。由于 MS/MS 在筛选母离子的过程中,将非目标离子抛出阱外而有效地降低基质的干扰,从而确保筛选分析有足够低的检出限,同时又保留了分子结构信息。

MS/MS 分析条件选择主要包括母离子、解离方式、CID 电压、RF 值。

2.2.1 母离子的选择 母离子的选取与方法的灵敏度和特征性有关。与四级杆质谱不同,离子阱质谱一般均呈较大丰度(>60%)的分子离子峰,在较高浓度时,甚至表现为 $M+1$ 峰。考虑到毛发样品中目标物浓度均很低,故原则上选取目标物的分子离子为母离子。其中 AMP、MAMP、MDA、MDMA 的 MSTFA 衍生化分子离子丰度较小(<10%),因而选取其基峰 m/z 116 和 m/z 130 为母离子。另外,美沙酮的一级质谱图较为简单,仅出现 m/z 72 碎片(基峰)和约 20%丰度的分子离子峰 m/z 310,如希望有较高的灵敏度,则可选取 m/z 72 为母离子。

以分子离子为母离子时,比较各目标物的一级质谱和二级质谱,发现在一定的 CID 下,大多数化合物的一级、二级谱图的主要质量碎片相同。但是由于二种质谱过程能量不同,因而质量碎片的丰度不同,而且二级谱中一般不出现低质量碎片。

2.2.2 解离方式的选择 对于母离子的诱导碰撞解离,可以选择共振和非共振两种方式。共振方式能量较大,所需 CID 电压较低。考虑到方法所涉目标物均为含芳烃、环状结构和共轭双键的化合物,裂解所需能量较大,故首先选取共振方式。其中可待因-TMS 采取共振方式时,产生的子离子过多、过杂,因而可待因-TMS 的二级质谱采用非共振方式。

2.2.3 CID 电压的选择 MS/MS 分析中对子离子谱影响最大的是 CID 电压。CID 电压可通过软件中 AMD 方法获得,即对一个母离子设定不同的 CID 电压,以考察该离子 MS/MS 分析的最佳条件。对不同的目标物应选取不同的 CID 电压,CID 电压过高,母离子完全碎裂,不易辨认;电压过低,子离子过少,无足够的结构信息。本研究的 CID 选取原则为:能产生足够特征的子离子谱,母离子丰度在 15~30%之间。

2.2.4 RF 值 研究发现,RF 值与 CID 电压有关,CID 随 RF 值的增加而增加(见表 3)。RF 值可通过软件计算获得,当采用默认 Q 值(0.4)计算所得的 RF 值时,CID 电压往往需大于 1,且 CID 值的变化将带来子离子谱的很大差异,因而使 CID 选取的工作量大大增加;而采用计算所得的 RF 值的 1/2 时,一般最佳 CID 在 0.3~0.8 之间,且 CID 值变化的敏感度下降。因而本研究原则上采用计算所得的 RF 值的 1/2。

表 3 MS/MS 分析中 RF 值与 CID 的关系

目标物	母离子 m/z	RF 值	CID 电压	子离子谱 m/z
度冷丁	247	40	0.3	172,218(5)
	247	60	0.4	172,218(8)
	247	100	0.6	172,218(8)
	247	150	0.8	172,218(10)
吗啡	429	48	0.6	414,429(15)
	429	60	0.8	414,429(20)
	429	95	0.9	414,429(18)
	429	190	1	429

2.3 GC/MS、SIS 和 GC/MS/MS 方法的比较

头发系含复杂生物基质的体系,有较多的内源性杂质,这些杂质经衍生化后,产生较高的背景干扰。另一方面,由于头发中目标物含量很低,一般不允许对其进行过多的净化处理。对于这种复杂体系的系统筛选分析,本研究比较了 GC/MS、SIS、GC/MS/MS 三种技术,发现 GC/MS 在存在背景干扰的情况下,认定较为困难,检测限值较高,不适合痕量检测,而运用 SIS 特别是 GC/MS/MS 技术,可有效降低背景对目标化合物的干扰,从而降低了检出限。

2.3.1 空白干扰 图 1 为空白头发按头发样品处理、衍生化后的 GC/MS、SIS、GC/MS/MS

图,scan 时最大内源性干扰物质的信号值达 3 Mcounts, SIS 方式最大干扰物质仅为 12 kcounts 左右,而 MS/MS 由于仅采集化合物的一个特定离子的子离子碎片,最大程度地避免了杂质干扰。

图 2 为空白头发添加 13 种毒品 GC/MS、SIS、GC/MS/MS 图,可以观察到相似的结果。

2.3.2 最低检出限 取空白头发 10 mg,分别添加不同浓度的 13 种毒品及代谢物的混合物,考察 GC/MS、SIS、GC/MS/MS 三种方法的最低检出限,发现 SIS 和 GC/MS/MS 法的灵敏度较高(见表 4),主要与所选离子在一级质谱图中的相对丰度有关;GC/MS 法灵敏度较低。

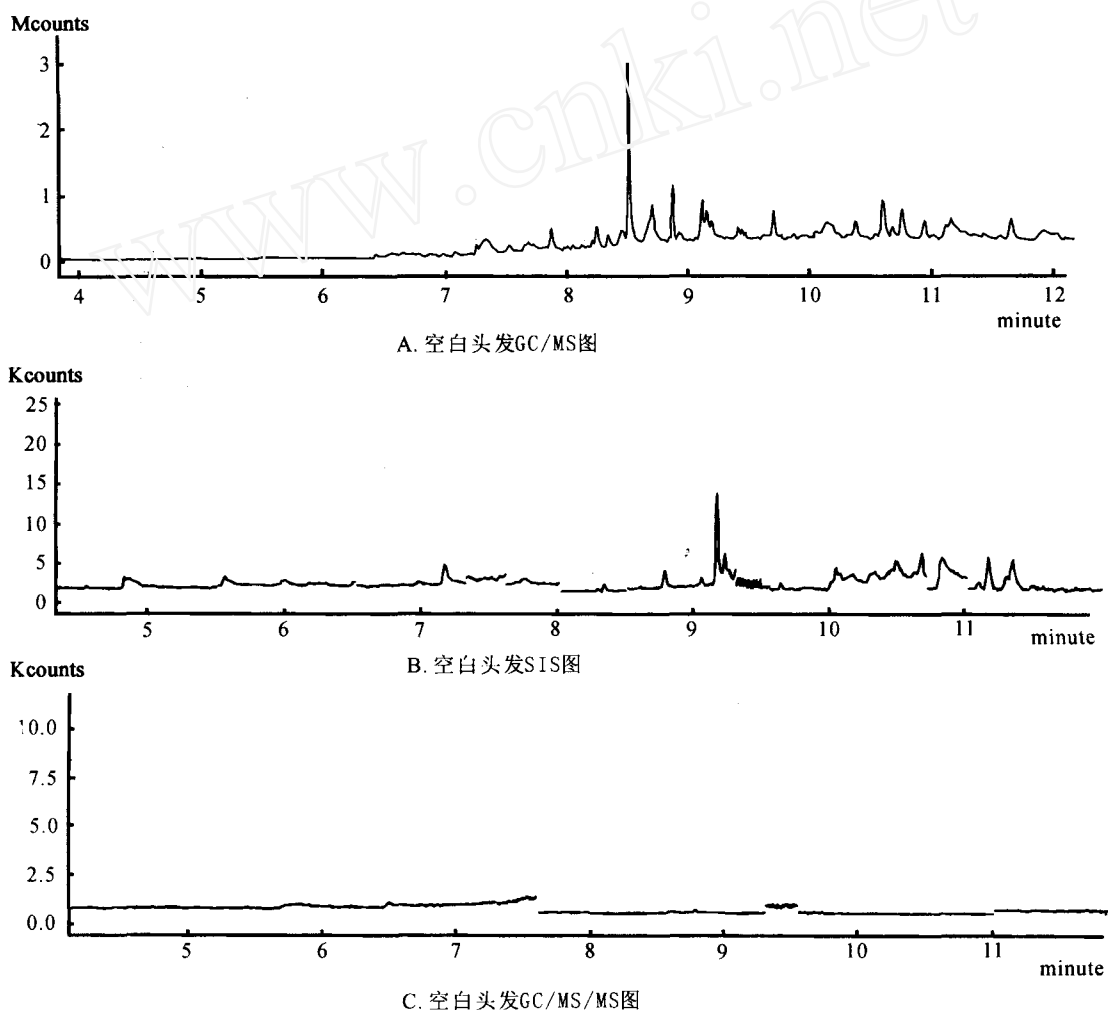


图 1 空白头发 GC/MS、SIS、GC/MS/MS 图

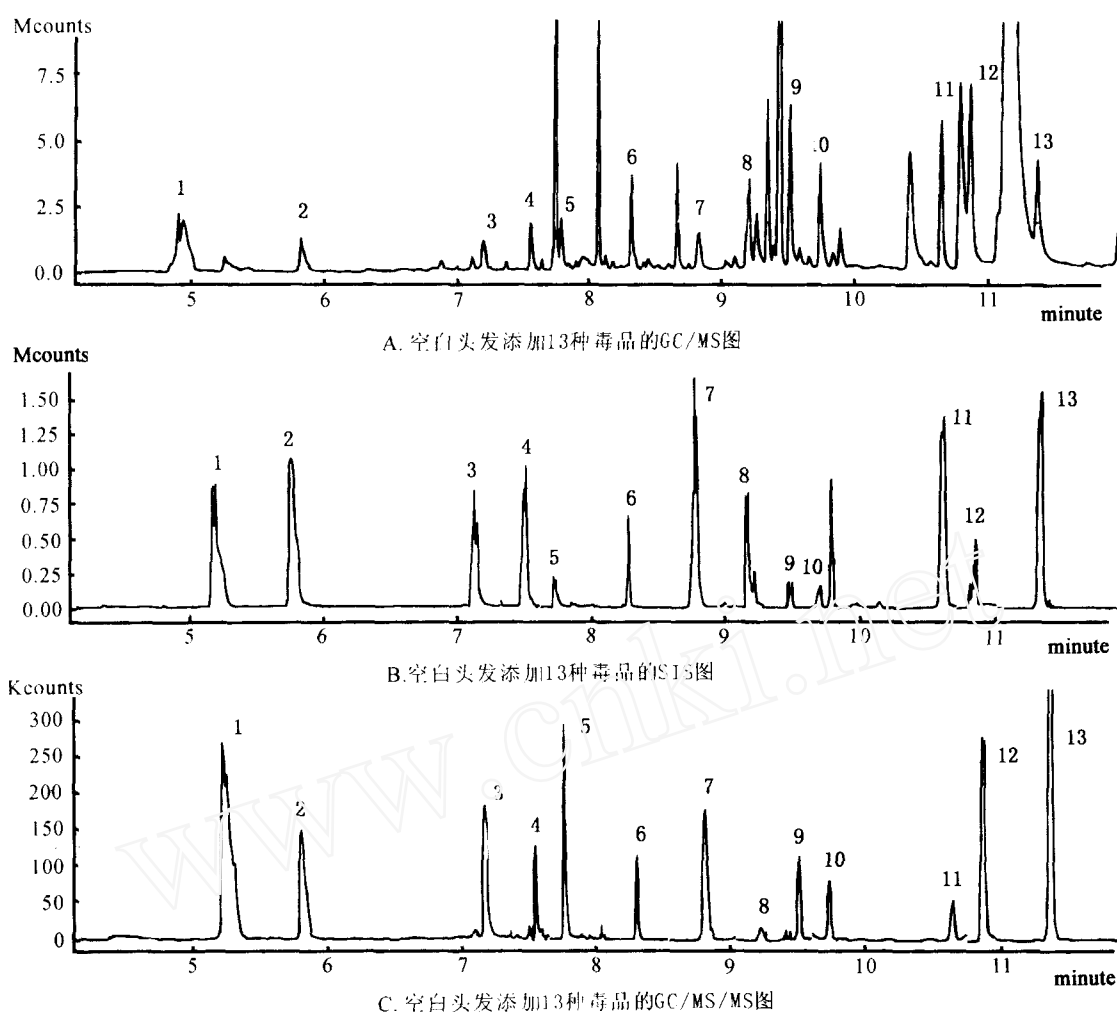


图 2 空白头发添加 13 种毒品的 GC/MS、SIS、GC/MS/MS 图

进一步考察发现,就目标物的绝对信号值而言,GC/MS>>SIS>GC/MS/MS,但因后者通过降低基线噪音而提高了信噪比,从而提高了灵敏度。图 3 为头发中可待因含量为 0.2 ng/mg 时的 GC/MS/MS、SIS、GCC/MS 图,信噪比分别为 56(56/1)、3(1271/467)、7(6710/938)。

3 结论

GC/MS/MS 技术分析头发中 13 种常见毒品及代谢物兼具有质谱 SIS 的高灵敏度特征和 scan 提供结构信息的功能,适合于低目标物浓度的复杂基质体系——头发中毒品及代谢物的系统筛选分析。

表 4 GC/MS、SIS、GC/MS/MS 法的最低检出限

化合物	最低检出限 (ng/mg)		
	GC/MS	SIS	GC/MS/MS
AMP	0.5	0.2	0.2
MAMP	0.5	0.2	0.2
MDA	0.02	0.01	0.01
MDMA	0.5	0.2	0.05
度冷丁	0.5	0.1	0.02
去甲度冷丁	2	2	2
EDDP	2	0.05	0.05
美沙酮	2	0.1	0.1
可卡因	0.5	0.2	0.5
苯甲酰芽子碱	2	0.2	0.5
可待因	0.2	0.2	0.05
吗啡	0.05	0.05	0.05
单乙酰吗啡	1	0.02	0.02

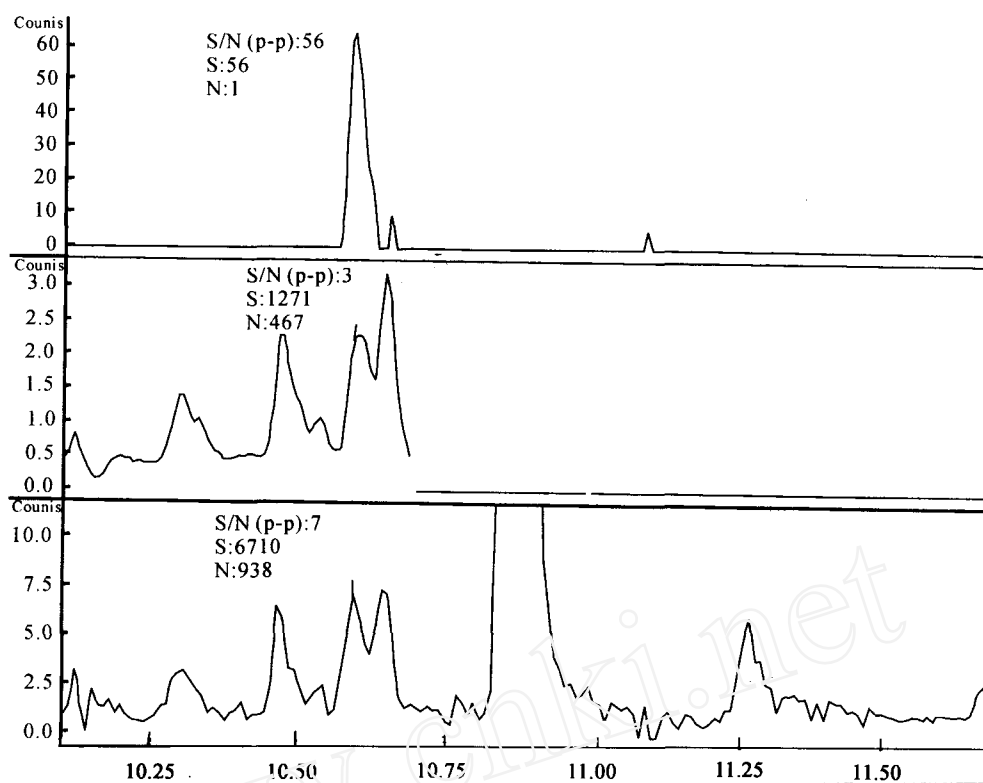


图 3 可待因(0.2 ng/mg)的 GC/MS/MS(上)、SIS(中)、GC/MS(下)图

参考文献:

- [1] Gaillard Y, Pepin G. Screening and Identification of Drugs in Human Hair by HPLC-photodiode-carry UV Detection and Gas Chromatography-mass Spectrometry after Solid-phase Extraction. A Powerful Tool Forensic Medicine. J. of Chromatogr. A, 1997, 762: 251~267.
- [2] Paterson S, McLachlan-Troup N, Cordero R, et al. Qualitative Screening for Drugs of Abuse in Hair Using GC-MS. J. Anal. Toxi., 2001, 25: 203~208.
- [3] Goldberger BA, Darraj AG. Detection of Methadone, Methadone Metabolites, and Other Illicit Drugs of Abuse in Hair of Methadone-treatment Subject Subjects. J. Anal. Toxi., 1998, 22: 526~530.
- [4] Shen Min, Xiang Ping, Shen Baohua. Detection of Meperidine and Its Metabolites in the Hair of Meperidine Addicts. Forensic Sci. Int., 1999, 103: 159~171.
- [5] 沈敏, 姜宴, 等. 毛发中违禁苯丙胺类的代谢研究. 质谱学报, 2000, 21(1): 7~13.
- [6] 沈敏, 向平, 等. 体液中常见滥用药物的系统筛选分析. 中国司法鉴定, 2001, 1(1): 1~6.

(下转第 20 页)

- [19] Waldhauser F, Saletu B, Trinchard-Lugan L. Sleep Laboratory Investigations on Hypnotic Properties of Melatonin. *Psychopharmacology* (Berlin), 1990, 100(2): 222~226.
- [20] Biella H, Fraschini F, Stakov B, et al. Melatonin Derivatives for Use in the Therapy of Sleep Disorders and in Pre-anaesthetic Mediation. *Eur Pat Appl EP513,702*. 19, Nov 1992.
- [21] Armstrong S M. Treatment of Sleep Disorders by Melatonin Administration. *Adv Pineal Res.*, 1991, 6: 263~274.

The Determination of Melatonin-Blood Concentration in a Patient by GC-MS-SIM

FU Liang-qing¹, LUO Chuan-huan², SHU Rong²

(1. Affiliated hospital, Academy of military medical sciences, Beijing 100039, China)

(2. Institute of radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: A method was set up by GC/MS-quantitative method with ISTD caffeine which can determine a new hypnosis drug---Melatonin. The Standard curve of Melatonin in blood is $Y = 0.0582 + 2.6067X$ ($r = 0.9994$). The blood concentration of Melatonin were determined in a patient after 20 mg Melatonin was administered, the C_{max} was 140.47 ng/mL at $T_{max} = 1h$, then Melatonin distributed and eliminated rapidly in the patient, and then not accumulate in the patient's body.

Key words: Melatonin; patient; blood concentration; GC/MS; SIM

=====

(上接第 16 页)

The Application of GC/MS/MS to Screening for Drugs of Abused in Hair

SHEN Min, SHEN Bao-hua, XIANG Ping

(Institute of Forensic Sciences, Ministry of Justice, Shanghai 200063, China)

Abstract: A screening system was established for simultaneous detection of abused drugs in hair by GC/MS/MS. The results showed that tandem mass spectrometry (MS/MS) technique can effectively reduce the background due to complex matrixes by excluding all unwanted ions except the parent ion, and has advantages of high sensitivity of SIS and structural information of scan. The recoveries of 13 abused drugs range from 68 to 101%, with low limits of detection (0.01~2ng/mL hair).

Key Words: abused drugs; screening system; hair analysis; GC/MS/MS