

全自动固相萃取仪与 GC/MS 的结合应用 ——生物检材中的药毒物检测分析

周 娣¹, 张文芳¹, 周 健²

(1. 北京市公安局法医检验鉴定中心毒化室, 北京 100085;

2. 山西省太原市人民检察院技术组, 山西 太原 030024)

摘要: 建立了全自动固相萃取仪与 GC/MS 结合测定生物检材中有机磷类农药、安眠镇静药及其它医用药物、吗啡类毒品的提取检测方法。经测定, 各类药毒物的回收率均可达 70% 以上。

关键词: 质谱学; 生物检材中药毒物分析; 固相萃取; GC/MS; 有机磷农药; 安眠镇静药; 吗啡类毒品

中图分类号: O 657. 63; R 991 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2002)04-0225-05

生物检材中微量毒物的分析检验一般可以分为提取和检测两个环节。固相萃取(SPE)是 70 年代以来在液相色谱原理基础上发展起来的新的分离提取方法。此法用于生物样品中微量药、毒物的萃取, 与传统的液-液萃取法相比, 操作简便、省力、省溶剂, 大大地增加了提取率, 不易产生乳化, 缩短样品的挥干时间, 并且可以实现样品处理的自动化, 已成为临床毒物学和法庭毒物学的药物分析中样品预处理方法的一个主要工具^[1]。高立勤等^[2]综述该技术的基本原理和方法, 近年来填料的改进, 操作方法的创新, 自动化仪器的发展及其在生物样本分析中的应用。文献[3, 4]综述了 SPE 技术在药物及毒物分析中的应用进展。王新春等^[5]对 SPE 的填料、SPE HPLC 技术及其自动化、SPE 操作的影响因素、SPE HPLC 在生物样品分析中的应用等方面进行了概括。文献[6~ 8]报道了固相萃取气相色谱法测量血浆和米中的有机磷农药以及地面水中半挥发性有机化合物。国内还开展了 SPE 与 HPLC、LC/MS 的结合应用研究^[9~ 11]。SPE 进行毒物研究分析已有报道^[12, 13], 文献[14, 15]报道了 SPE 与 GC/MS 结合应用分析白藜芦醇和二

恶烷, 将此方法应用于生物样品中药物毒物的分析研究尚少^[16]。

本工作应用自编 A spec 程序, 采用 BAKERBOND SPETM (十八烷基 C18) 小柱, 使用固相柱来提取净化生物检材中的微量药(毒)物, 结合 GC/MS 对净化后的样品进行检索。

1 实验部分

1.1 主要仪器

VARIAN SATURN 3 GC/MS 系统: 带自动进样器; 色谱柱: 弹性毛细管柱 BPX-5 (25 m × 0.22 mm × 0.25 μm); 固相自动萃取仪 ASPECTM XL: 吉尔森公司出品; 色谱预处理 C18 柱 (4 cm × 0.5 cm): 吉尔森公司出品。

1.2 主要试剂

无水乙醇、甲醇、氯仿、异丙醇、乙酸乙酯、氨水: 均为分析纯, 北京益利精细化学品有限公司产品; 0.01 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 3.3): 57.5 μL 冰醋酸稀至 100 mL; 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0): 6 g 磷酸二氢钠溶于 450 mL 去离子水中, 用 1.0 mol/L 氢氧化钠调至 pH (6.0 ±

收稿日期: 2002-08-20

作者简介: 周娣 (1969~), 女 (汉族), 安徽人, 硕士, 工程师, 毒物与毒品分析专业

E-mail: schjxiner@hotmail.com



0.1) 后定容至 500 mL。

1.3 标准溶液配制

(1) 有机磷类农药: 取敌敌畏、对硫磷、乐果各一定量, 配制成各成分均为 100 mg/L 的乙醇液。

(2) 巴比妥类安眠药: 取苯巴比妥、速可眠、烯丙异丙巴比妥、异戊巴比妥、巴比妥逐一定量, 配制成各成分均为 100 mg/L 的乙醇液;

(3) 吩噻嗪及其它药物类: 氯氮平、扑尔敏、氯丙嗪、多虑平、氨基比林逐一定量, 配制成各成分均为 100 mg/L 的乙醇液;

(4) 安定类安眠药: SKF525、安定、舒乐安定、三唑仑逐一定量, 配制成各成分均为 100 mg/L 的乙醇液。

1.4 GC/MS 联用仪条件

起始温度 130 (保持 1 min), 程序升温速率 10 /min, 终止温度 280, 保持 25 min, GC 与 MS 传导温度 260; 载气为高纯氦气, 分流比 20:1, 流量 1.0 mL/min; 离子流电压 70 eV; 倍增管电压 1850 V; 电流强度 10 μ A。

2 实验方法

2.1 空白血添加各混合药物制备待检血的方法

(1) 空白血添加有机磷类药物

取 3 mL 血样, 添加有机磷类农药标准溶液 0.06 mL, 配成含药物为 2 mg/L 的检血, 用 pH6.0 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L) 9 mL 稀释, 平均分成 3 份, 混合均匀, 离心, 取上清液待用。

(2) 空白血添加安眠药及其它医用药物

将 9.4 mL 血添加巴比妥类安眠药、吩噻嗪及其它药物类、安定类安眠药标准溶液各 0.2 mL, 配成含各药物成分为 2 mg/L 的检血, 每份取 3 mL 共 3 份, 分别用 pH6.0 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L) 3 mL 稀释, 混合均匀, 离心, 取上清液待用。

2.2 固相柱提取净化样品的方法与步骤

(1) 有机磷药物提取

柱活化: 分别用 5 mL 甲醇及 5 mL pH6.0 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L) 淋洗固相小柱, 流速 1.5 mL/min, 以便使整个固相小柱处于水溶性状态。

加样: 将上述制备好的有机磷血样加入到已活化好的 C_{18} 柱, 通过柱上方加压方法, 使样品流速控制为 0.5 mL/min。

柱洗涤: 用 6 mL 去离子水洗涤小柱 (1.5 mL/min), 以除去弱保留的亲水杂质和色素干扰, 之后空气加压, 流速为 50 mL/min (程序控制)。通氮气干燥小柱 10 min (程序控制)。

洗脱及浓缩: 用 6 mL 氯仿或乙酸乙酯将柱中吸附的农药洗脱下来, 收集洗脱液, K·D 浓缩至 0.1 mL, 取 1 μ L 进行 GC/MS 分析。

(2) 常检药物及安眠药提取

柱活化、加样及干燥小柱与有机磷药物提取操作步骤相同, 柱洗涤分别用 3 mL 去离子水及 3 mL pH6.0 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L)。

洗脱及浓缩: 先用 3 mL V (氯仿) : V (丙酮) = 1 : 1, 再用 3 mL 2% 充 V (氯仿) : V (异丙醇) = 4 : 1 溶剂, 流速均为 1.0 mL/min, 收集洗脱液浓缩至 0.1 mL, 取 1 μ L 进行 GC/MS 分析。

(3) 尿液中吗啡类毒品的固相萃取方法

柱活化、加样及干燥小柱与有机磷药物提取操作步骤相同; 柱洗涤分别用 3 mL 去离子水及 0.5 mL pH3.3 醋酸缓冲液 (0.01 mol/L);

洗脱及浓缩: 3 mL 2% 充 V (氯仿) : V (异丙醇) = 4 : 1 溶剂, 流速为 1.0 mL/min, 收集洗脱液浓缩至 0.1 mL, 取 1 μ L 进行 GC/MS 分析。

(4) 腐败肝脏中萃取安眠药方法

取腐败肝脏 2 g, 添加酸碱内标 (烯丙异丙巴比妥、SKF525) 10 mg/L, 加入 2 mL 4 mol/L 盐酸, 在 50 $^{\circ}$ C 水浴中水解 1 h, 再用 10% NaOH 将溶液调制 pH = 6 左右, 离心, 备用; 用 C_{18} 小柱萃取前几步均与常检药物及安眠药提取步骤相同, 取 1 μ L 进行 GC/MS 分析。

2.3 固相自动萃取仪 ASPECTM XL 萃取程序

- (1) 开始循环;
- (2) 用溶剂 A 活化淋洗柱 DEC-A;
- (3) 用溶剂 B 活化淋洗柱 DEC-A;
- (4) 样品 A 装入动态淋洗柱 DEC-A;
- (5) 冲洗 ASPEC 进样针;
- (6) 用溶剂 C 淋洗 DEC-A;
- (7) 用溶剂 B 淋洗 DEC-A;
- (8) 吹干 DEC-A 10 min;
- (9) 用溶剂 D 洗脱收集器 A;
- (10) 用溶剂 E 洗脱收集器 A;
- (11) 结束循环。

其中 solvent-A、B、C、D、E, 甚至 F、G、H、I

J、K 等均可在程序中设置试剂瓶位置, 续添试剂直接注入固定试剂瓶即可。

3 结果和讨论

3.1 血中有机磷农药的回收率

在实验中分别采用氯仿及乙酸乙酯进行 C₁₈ 柱的洗脱, 其平均回收率结果列于表 1。

从表 1 可以看出, 氯仿及乙酸乙酯对有机磷农药的回收率接近, 在浓缩过程中, 乙酸乙酯挥干的时间较长。

表 1 C₁₈ 柱的洗脱平均回收率 (n=3)

Table 1 Average recoveries of C₁₈ column washing (n=3)

淋洗剂 (Washing solvent)	Y/%		
	敌敌畏 (Dichlorvos)	对硫磷 (Parathion)	乐果 (Rogor)
氯仿 (Chloroform)	72.9	98.5	99.2
乙酸乙酯 (Acetic ether)	61.7	96.5	98.6

3.2 安眠药及其它医用药物的平均回收率

安眠药及其它医用药物其平均回收率 Y 结果列于表 2。

3.3 洗柱过程中甲醇对回收率的影响

有文献报道^[13], 在淋洗小柱过程中, 需要加

表 2 安眠药及其它医用药物其平均回收率 (n=3)

Table 2 Average recoveries of opiate and other medical drugs (n=3)

药物 (Drugs)	Y/%
苯巴比妥 (Phenobarbitone)	109.0
速可眠 (Secobarbital Sodium)	84.1
烯丙异丙巴比妥 (Aprobarbital)	86.7
异戊巴比妥 (Amobarbitalum)	89.4
巴比妥 (Bbiturate)	99.0
氯氮平 (Cozapine)	83.8
扑尔敏 (A laspan)	84.4
氯丙嗪 (Chlorpromazine)	80.7
多虑平 (Doxepin)	78.1
氨基比林 (Amidopyrinum)	69.2
SKF ₅₂₅	89.2
安定 (Diazepam)	81.9
舒乐安定 (Surazepam)	78.3
三唑仑 (Sanzolun)	116.5

入一些甲醇以替换小柱中残存的水分, 本研究对这一结论做了如下实验。

选取配制的巴比妥类安眠药标准溶液添加在血样中, 制备成含药物均为 2 mg/L 的检血, 在淋洗步骤中, 其中一个血样增加 50 μL 甲醇淋洗, 另一个血样没有甲醇淋洗, 结果列于表 3。

由此可见, 仅仅是加入极少量的甲醇, 就可引起回收率的急剧降低。因此建议在固相萃取淋洗小柱过程中, 为避免药毒物的损失, 最好不要加入甲醇。

表 3 甲醇对回收率的影响

Table 3 Influences of methanol on recovery

淋洗 (Washing)	Y/%				
	苯巴比妥 (Phenobarbitone)	速可眠 (Secobarbital Sodium)	烯丙异丙巴比妥 (Aprobarbital)	异戊巴比妥 (Amobarbitalum)	巴比妥 (Bbiturate)
无甲醇 (No methane)	113	74.1	80.7	79.4	109.0
有甲醇 (With methane)	32.9	42.7	37.8	46.2	32.8

3.4 尿液中吗啡类毒品的固相萃取

在液-液提取过程中, 为提取海洛因在体内的代谢产物吗啡, 需要严格控制尿液的 pH 值在 8.7~9.0, 即使采用 GC/MS 单离子检索, 在许多吸毒者的尿液中海洛因的四个代谢产物也不好辨认, 常常需要依据经验, 根据其保留时间扣

掉背景来进行鉴别。在采用 C₁₈ 柱提取净化过程中, 在药物洗脱前加 0.5 mL pH 3.3 醋酸缓冲液 (0.01 mol/L) 使固相柱保持略酸性状态, 可以使药物回收率特别是吗啡的回收得到很大提高, 四个代谢物的峰型尖锐并且突出, 说明提取效果不错。

3.5 液-液提取与固相萃取的比较

腐败肝脏中添加的 10 mg/L 酸碱内标经过酸性水解之后, 采用液液提取, 常常有检不出的现象, 而采用如上腐败肝脏中萃取安眠药步骤经过 C_{18} 固相萃取之后, 酸碱内标依然存在并且可检出。

取用同一个敌敌畏中毒死亡案件的血样 2 mL , 分别用液液提取及 C_{18} 固相萃取检测结果分别为: 液-液提取为 2.03 mg/L , 说明固相萃取为 2.6 mg/L , 固相萃取相对于液-液提取有较高的回收率。

采用液-液提取生物检材中的药毒物, 在 GC/MS 检测谱图中可发现, 胆固醇的残留量很大, 在污染了柱子的同时, 也影响了其它药毒物的检测灵敏度, 而采用固相萃取法, 大部分的胆固醇滞留在固相小柱中, GC/MS 谱图中可发现的胆固醇量大大低于液液提取后的残余量, 见图 1。

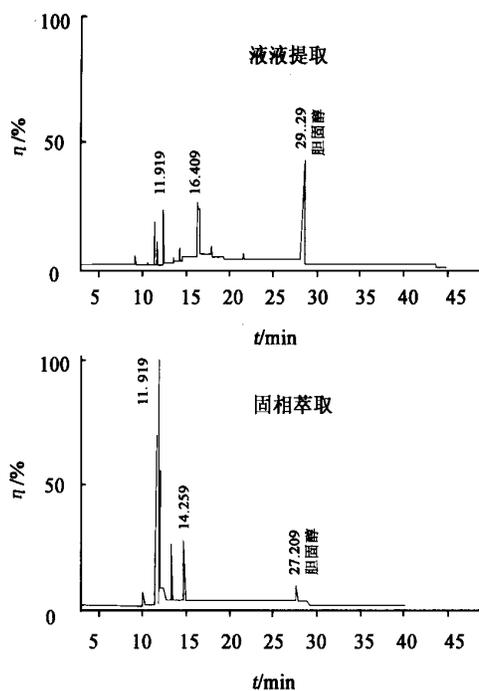


图 1 液-液提取与固相萃取生物检材中的药毒物 GC/MS 图比较

Fig 1 GC/MS spectra of poisonous drugs in biology samples by liquid-liquid extraction and solid-phase extraction

参考文献:

- [1] McDowall RD. Sample Preparation for Biomedical Analysis[J]. J Chromatogr, 1989, 3: 492
- [2] 高立勤, 刘文英. 固相萃取技术及其在生物样本分析中的应用与进展[J]. 药学进展, 1997, 1: 8~13
- [3] 朱晓东. 固相萃取技术在药物及毒物分析中的应用进展[J]. 国外医学(临床生物化学与检验学分册), 2000, 2
- [4] Chen Xiao-Hua. Solid-Phase Extraction for Systematic Toxicological Analysis: An Overview. Forensic Science Review, 1992, 4(2): 147~159
- [5] 王新春, 阳长明, 侯世祥, 等. 固相萃取-高效液相色谱法在生物样品分析中的应用与进展[J]. 中国医院药学杂志, 2001, 12: 747~748
- [6] 冯翠玲, 周永新, 吴鹤松, 等. 血浆中有机磷农药的固相萃取-气相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2001, 3: 78~80
- [7] 龙苏, 周毅刚, 王晓春, 等. 固相萃取气相色谱法测定大米中多种有机磷农药残留量[J]. 实用预防医学, 2001, 5: 341~342
- [8] 郁建栓. 固相萃取气相色谱质谱法测定地面水中半挥发性有机化合物[J]. 仪器仪表学报, 2001, S2: 357~358
- [9] 王勇, 曾洁. 固相萃取技术-HPLC 测定复方甘草片中吗啡的含量[J]. 色谱, 1998, 3: 229~231
- [10] 兰彦. 自动固相萃取工作站与定量生物分析液相色谱-质谱联用技术. 国外医学(药学分册), 1999, 6: 376
- [11] 任晋, 黄翠玲, 赵国栋, 等. 固相萃取-高效液相色谱-质谱联用在线分析水中痕量除草剂[J]. 分析化学, 2001, 8: 876~880
- [12] 谭家镒, 姜兆林, 吴玉红, 等. 固相萃取-紫外导数光谱法测定脏器组织中巴比妥类药物含量[J]. 中国法医学杂志, 1995, 10: 158
- [13] 王芳琳, 刘耀, 封世珍, 等. 生物体内吩噻嗪类药物的分析[R]. 公安部物证鉴定中心内部资料
- [14] 马亭, 李攻科, 李晓东, 等. 葡萄酒中白藜芦醇的固相萃取 GC/MS 法测定及其生理活性的初步研究[J]. 高等学校化学学报, 2000, 7: 1023~1027
- [15] 黄业茹, 施钧慧, 唐莉. 固相萃取工业废水中二恶烷的 GC/MS 分析[J]. 质谱学报, 2001, 1: 70~74
- [16] 李莉, 周永新, 罗毅. 固相萃取结合 GC/MS 系统分离分析生物体液中常见毒物药物[J]. 药学报, 2000, 7: 521~525

Automatic SPE Apparatus Combined With GC/MS for Detection and Analysis of Drugs in Biological Samples

ZHOU Di¹, ZHANG Wen-fang¹, ZHOU Jie²

(1. Department of Legal Medical Expert Appreciation of Peking Police, Beijing 100085, China;

2. Department of Technology, Municipal People's Procuratorate, Taiyuan 030024, China)

Abstract The paper describes the techniques of extraction of organophosphorus agricultural chemicals, hypnotics and other caffeine drugs in biology samples using A SPECTM XL combined by GC/MS. The results indicate that recovery rate of all drugs is over 70%.

Key words mass spectrometry; analysis of poisonous drugs in biology samples; A SPECTM XL; GC/MS; organophosphorus; hypnotic; opium

新书推荐

分析化学

Analytical Chemistry

【编者】 R. Kellner, J. M. Memmet, M. Otto, H. M. Widmer 等

【译者】 李克安, 金钦汉等. 2001 年北京大学出版社出版 【ISBN】: 7-301-04749-5/O. 492

【简介】 本分析化学教材是 DAC 分析化学课程的权威版本, 脱胎于以前的“W PAC”(分析化学工作组)的全欧课程。其理念是要在分析化学的传统方法、生物和物理分析及化学计量学之间寻求一种平衡。

本书是由欧洲化学会分析化学部组织 14 个国家的 31 位分析化学家编写的国际性教科书。全书分 5 个部分共 16 章, 内容包括: 1) 分析化学的目的及其对社会的重要作用; 2) 分析过程。讨论全分析过程的各个步骤, 并详细说明表征分析方法特性的基本概念, 强调用户与分析工作者之间相互配合的重要性; 3) 质量保证和质量控制。提出可靠性、精密度、准确度和有效性的实际问题, 认识质量系统在分析工作中的经济价值; 4) 化学分析的基本原理; 5) 色谱法。介绍气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)和离子色谱(IC), 并概述一些新的方法, 如超临界流体色谱(SFC)、毛细管电泳(CE)和场流分离(FFF); 6) 动力学催化。介绍化学动力学的基本概念, 了解通过测量反应速率及监测反应的物理或化学动力学过程来实现的分析方法的理论基础; 7) 化学分析方法及应用; 8) 元素分析。介绍原子发射光谱法、原子吸收光谱法、X 射线荧光光谱法、活化分析及无机质谱法; 9) 化合物和分子特效分析。介绍紫外-可见、红外、拉曼、¹H 和 ¹³C 核磁共振和质谱, 描述分子光谱的进样、测量和评价及典型应用; 10) 微束流和表面分析。介绍光子探针、电子探针、离子探针、场探针和扫描探针技术及其分析性能; 11) 结构分析; 12) 化学计量学; 13) 计算机硬、软件及分析仪器接口; 14) 联用技术; 15) 微分析系统。介绍分析系统微型化的原理和发展概况及装配方法; 16) 过程分析化学。介绍过程和实验分析仪器设备的区别。

本书附录列举了涉及分析化学的符号及术语的中、英文索引。可供从事分析化学教学、科研及分析测试人员及化学、生物、医学、材料、地质等学科的大学生、研究生阅读参考。