

固相萃取-液相色谱-串联质谱法 检测血液中海洛因及其代谢产物

张松¹, 曹峻华¹, 刘文文²

(1. 重庆市公安局交通管理局, 重庆 400054; 2. 重庆市公安局物证鉴定中心, 重庆 400021)

摘要:建立了固相萃取-液相色谱-串联质谱(SPE-LC-MS/MS)法分析吸毒者血样中的 *O*⁶-单乙酰吗啡、吗啡、3-β-*D*-葡萄糖醛酸吗啡。以 3-β-*D*-葡萄糖醛酸吗啡-*d*₃ 为内标, 选取 Oasis HLB 为固相萃取柱, AtlantisTM dC18(150 mm×3.9 mm×5 μm) 色谱柱为分析柱, 采用甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱; 采用电喷雾正离子电离源, 多反应监测(MRM)扫描方式, 通过两对母离子/子离子和保留时间定性定量检测目标化合物。结果表明: 血样中 *O*⁶-单乙酰吗啡、吗啡、3-β-*D*-葡萄糖醛酸吗啡的检测限为 3~5 μg/L, 线性关系良好, 相关系数均在 0.997 5 以上; 添加 50、500、1 000 μg/L 加标水平后, *O*⁶-单乙酰吗啡、吗啡、3-β-*D*-葡萄糖醛酸吗啡的平均回收率为 80.6%~98.9%, 准确度为 -7.3%~9.1%。该方法具有较高的灵敏度和选择性, 可用于实际案件中海洛因及其代谢产物的检测。

关键词:液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS); 固相萃取(SPE); *O*⁶-单乙酰吗啡; 吗啡; 3-β-*D*-葡萄糖醛酸吗啡

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2015)04-0367-05
doi: 10.7538/zpxb.youxian.2015.0020

Determination of Heroin and Its Metabolites in Addicts' Blood by Solid Phase Extraction and LC-MS/MS

ZHANG Song¹, CAO Jun-hua¹, LIU Wen-wen²

(1. Chongqing Traffic Management Bureau, Chongqing 400054, China;
2. Chongqing Institute of Forensic Science, Chongqing 400021, China)

Abstract: *O*⁶-Monoacetylmorphine, morphine, morphine-3-β-*D*-glucuronide in addicts' blood samples were analyzed by solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were extracted by extraction column (Oasis HLB), and then were flushed into the analytical column (AtlantisTM dC18 (150 mm×3.9 mm×5 μm)) with methanol and water containing formic acid as mobile phase and morphine-3-β-*D*-glucuronide-*d*₃ as internal standard. The positive electric spray ionization, multiple reaction monitoring (MRM) mode were applied to analyze target compounds. Identification was based on the compound's retention time and two

收稿日期: 2014-08-22; 修回日期: 2014-12-01

作者简介: 张松(1978—), 男(汉族), 山东济宁人, 工程师, 从事理化检验工作。E-mail: zhangsong_2008@163.com

网络出版时间: 2015-05-26; 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20150526.0915.006.html>

pairs of precursor-to-product ion transitions. The results show that the limit of detections are 3-5 $\mu\text{g/L}$ for morphine, O^6 -monoacetylmorphine and morphine-3- β -D-glucuronide. The linear relationship is well, and the linear correlation coefficient is greater than 0.997 5. The average recoveries are 80.6%-98.9% with the spiked levels of 50, 500, 1 000 $\mu\text{g/L}$, and the accuracies are -7.3%-9.1%. The method has high sensitivity and selectivity, which is suitable for analyzing the heroin and its metabolites in addicts' blood samples.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); solid phase extraction (SPE); O^6 -monoacetylmorphine; morphine; morphine-3- β -D-glucuronide

海洛因又称双乙酰吗啡,是目前依赖潜力最强的毒品,成瘾者对其具有高度的心理及生理依赖性,难以戒除。因此,及时准确地检测海洛因及其代谢产物,对于防止毒品泛滥、禁毒及戒毒、保护人民身心健康具有重大意义。海洛因在体内的代谢较快,经体内的酯酶水解成单乙酰吗啡(主要是 O^6 -单乙酰吗啡),继而代谢成吗啡,吗啡的 3 位酚羟基和 6 位醇羟基分别与葡萄糖醛酸结合,绝大部分生成 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡(M3G),少量转化为 6- β -D-葡萄糖醛酸吗啡(M6G)^[1-2]。因此,在人体内很难检测到海洛因原体, O^6 -单乙酰吗啡则作为特征代谢产物被用于判断是否摄入海洛因的依据。

海洛因及其主要代谢产物的常用检测方法有 GC/MS 法^[3-5]、高效液相色谱法(HPLC)法^[6-7]、LC/MS^[8-9]法及 LC-MS/MS 法^[10-12]等。其中,GC/MS 法需要酸水解,整个过程的检材量大、操作复杂、不易控制、无法准确定量;HPLC 法的检测器灵敏度较低,在检测药物含量较低时会导致无法检出;LC/MS 法的抗干扰能力较差;而 LC-MS/MS 法将液相色谱的高效在线分离能力与串联质谱的高灵敏度、高选择性集于一体,能够满足实际检测的要求。

本研究拟采用固相萃取法(SPE)对检材进行前处理,LC-MS/MS 法检测血液中海洛因及其主要代谢产物(O^6 -单乙酰吗啡、吗啡、3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡),旨为临床、法医毒物分析检测提供方法参考。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

API2000 LC-MS/MS 联用仪:美国 ABI 公

司产品;LC-20A 型高效液相色谱仪,Caliper Rapid Trace 固相萃取仪:日本岛津公司产品;AE240 电子天平(十万分之一):瑞士 Mettler 公司产品;Beckman Allegra X-22R Centrifuge 型冷冻离心机:美国 Beckman 公司产品;Millipore Direct-Q3 型纯水机:美国 Millipore 公司产品。

海洛因、吗啡、3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡标准品及 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡- d_3 (M3G- d_3)内标物:均由国药公司提供;甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

实验数据采用 Analyst1.4.1 分析软件处理。

1.2 溶液的配制

分别准确量取 1 mg O^6 -单乙酰吗啡、吗啡、M3G 标准品于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成 100 mg/L 混合标准样品储备液。分别准确量取 0.1、0.2 mL 混合标准样品储备液于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成 1、2 mg/L 混合标准工作液。取 0.05 mL 100 mg/L M3G- d_3 标准品于 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成 100 $\mu\text{g/L}$ 内标工作液。

1.3 工作曲线的绘制

将 100 mg/L 混合标准样品储备液分别配制成 0.1、0.5、1.5、20 mg/L 5 个不同浓度的混合标准品溶液,取 5 份 0.9 mL 空白全血,依次加入 0.1 mL 各浓度的混合标准品溶液,混匀后,用含 1.5 mL 100 $\mu\text{g/L}$ M3G- d_3 的水溶液稀释,离心,经固相萃取柱(Oasis HLB)萃取后,用液相色谱-质谱联用仪检测,由 Analyst1.4.1 分析软件绘制标准曲线。

1.4 样品处理方法

向 1 mL 血液样品中加入含 1.5 mL 100 $\mu\text{g/L}$ M3G- d_3 的水溶液稀释,离心,取上清液,待过

柱;取 Oasis HLB 固相萃取柱,依次加入 1 mL 甲醇、1 mL 去离子水活化,取上清液过柱,然后用 1 mL 去离子水清洗,2 mL 甲醇洗脱,氮气吹干,0.5 mL 初始流动相溶解,待检测。

1.5 实验条件

1.5.1 液相色谱条件 色谱柱:Atlantis™ dC18 柱(150 mm×3.9 mm×5 μm);流速 0.5 mL/min;柱温 35 °C;进样量 20 μL;流动相:甲醇(A)和 0.1%甲酸水溶液(B);梯度洗脱:0~3 min、

20%A~90%A,3~9 min、90%A~20%A;总采样时间 12 min。

1.5.2 质谱条件 电喷雾(ESI)离子源,多反应监测(MRM)扫描方式,正离子扫描,电喷雾电压 5 200 V,雾化气压力 35 Pa,气帘气压力 20 Pa,离子源温度 400 °C,碰撞气为氩气。每个化合物设两对母离子/子离子(3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡和内标只有 1 对母离子/子离子响应较明显),各 MRM 参数列于表 1。

表 1 吗啡、3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡、内标、O⁶-单乙酰吗啡、海洛因的 MRM 参数

Table 1 MRM parameters of morphine, M3G, M3G-d₃, O⁶-monoacetylmorphine and heroin

| 名称 | 保留时间/min | 定量离子对(m/z) | 定性离子对(m/z) | 碰撞能量/eV |
|-----------------------|----------|-------------|-------------|---------|
| 吗啡 | 5.81 | 286.1/165.1 | 286.1/165.1 | 52.0 |
| | | | 286.1/201.1 | 35.0 |
| M3G | 4.61 | 462.2/286.1 | 462.2/286.1 | 41.0 |
| M3G-d ₃ | 4.61 | 465.2/289.1 | 465.2/289.1 | 41.0 |
| O ⁶ -单乙酰吗啡 | 7.29 | 328.0/165.1 | 328.0/165.1 | 49.0 |
| | | | 328.0/211.2 | 35.0 |
| 海洛因 | 8.49 | — | 370.1/165.1 | 63.0 |
| | | | 370.1/268.2 | 39.0 |

注:—表示不稳定,无法定量

2 结果与讨论

2.1 色谱图

按 1.5 节条件测得的人空白全血色谱图中不存在 3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、O⁶-单乙酰吗啡、海洛因等药物的干扰,也无其他杂质,说明本方法的特异性良好。

3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡及内标、吗啡、O⁶-单乙酰吗啡、海洛因在 1.5.1 节条件下的保留时间分别为 4.61、5.81、7.29、8.49 min,色谱行为良好,其总离子流色谱图示于图 1。

2.2 线性关系、检测限与定量下限

取经 1.2 和 1.4 节处理好的样品,用液相色谱-串联质谱仪分析,以峰面积与内标峰面积之比(y)对样品中化合物的浓度(x)作图,各化合物的线性关系良好;当信噪比 S/N=3 时,3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、O⁶-单乙酰吗啡的定量下限均为 10 μg/L;各化合物的检测限、线性回归方程和相关系数列于表 2。

2.3 回收率、精密度及准确度

向空白全血中添加低、中、高 3 个质量浓

度的混合标准工作液,使添加标样的浓度分别为 50、500、1 000 μg/L,每个加标水平取 5 个平行样,测得各加标水平的平均回收率,同时计算各浓度血样测定结果的准确度,结果列于表 3。重复测定低、中、高浓度的样品 6 次,得到日内精密度;连续测定 4 天,得到日间精密度,结果列于表 4。

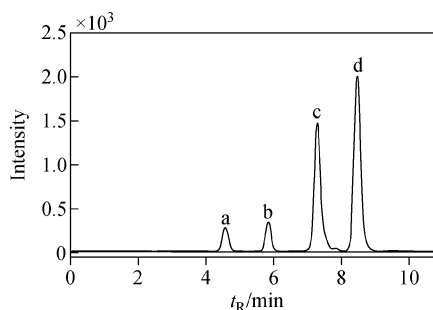


图 1 3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡及内标(a)、吗啡(b)、O⁶-单乙酰吗啡(c)和海洛因(d)的总离子流色谱图
Fig.1 Total ion chromatogram of M3G and M3G-d₃ (a), morphine (b), O⁶-monoacetylmorphine (c) and heroin (d)

表 2 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡和 O^6 -单乙酰吗啡的检测限、定量限和线性关系Table 2 The detection limits, quantification limits, linear equations and coefficients of M3G, morphine and O^6 -monoacetylmorphine

| 药物名称 | 检测限/($\mu\text{g/L}$) | 定量下限/($\mu\text{g/L}$) | 线性范围/($\mu\text{g/L}$) | 线性方程 | 相关系数 |
|--------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|--------|
| 吗啡 | 5 | 10 | 10~2000 | $y=8.96x+0.0335$ | 0.9986 |
| M3G | 3 | 10 | 10~2000 | $y=7.38x+0.0359$ | 0.9989 |
| O^6 -单乙酰吗啡 | 5 | 10 | 10~2000 | $y=8.19x+0.0248$ | 0.9975 |

表 3 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡的回收率和准确度Table 3 The recoveries and accuracies of M3G, morphine, O^6 -monoacetylmorphine

| 化合物 | 添加 50 $\mu\text{g/L}$ | | 添加 500 $\mu\text{g/L}$ | | 添加 1000 $\mu\text{g/L}$ | |
|--------------|-----------------------|-------|------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | 回收率/% | 准确度/% | 回收率/% | 准确度/% | 回收率/% | 准确度/% |
| 吗啡 | 80.6 | 6.5 | 84.5 | 4.1 | 92.9 | 2.3 |
| M3G | 81.5 | -7.3 | 90.3 | -2.3 | 98.9 | 5.6 |
| O^6 -单乙酰吗啡 | 87.6 | 9.1 | 89.4 | 5.3 | 93.1 | 8.2 |

表 4 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡的日内和日间精密度Table 4 The intra-day and inter-day precisions of M3G, morphine, O^6 -monoacetylmorphine

| 化合物 | 浓度 50 $\mu\text{g/L}$ | | 浓度 500 $\mu\text{g/L}$ | | 浓度 1000 $\mu\text{g/L}$ | |
|--------------|-----------------------|---------|------------------------|---------|-------------------------|---------|
| | 日内精密度/% | 日间精密度/% | 日内精密度/% | 日间精密度/% | 日内精密度/% | 日间精密度/% |
| M3G | 0.9 | 2.6 | 2.6 | 4.6 | 2.1 | 4.2 |
| 吗啡 | 2.6 | 1.8 | 3.9 | 2.4 | 2.1 | 1.9 |
| O^6 -单乙酰吗啡 | 1.8 | 1.5 | 2.4 | 2.7 | 1.9 | 3.6 |

注:日内精密度 $n=6$, 日间精密度 $n=4$

2.4 实际应用举例

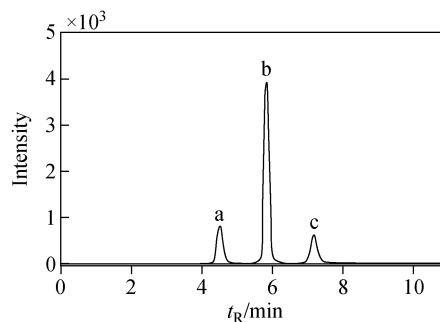
案例 1:2013 年 7 月,李某驾驶小型轿车在重庆市某区人民法院前路段与 6 车发生连续相撞,造成 1 人重伤,7 车受损的重大道路交通事故。事故发生后,民警发现李某有吸毒驾驶机动车嫌疑,后在李某血液中检出吗啡和 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡,其含量分别为 126 $\mu\text{g/L}$ 、83 $\mu\text{g/L}$ 。

案例 2:2014 年 2 月,在重庆市南岸区发生了一起司机刘某死于自己车内的事件,其右手握有塑料针管,针头部分有血迹。后在死者所持针管中检出海洛因、单乙酰吗啡;在刘某血液中检出 O^6 -单乙酰吗啡、吗啡和 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡,其含量分别为 221 $\mu\text{g/L}$ 、983 $\mu\text{g/L}$ (已达致死量)、392 $\mu\text{g/L}$,其色谱图示于图 2。

3 结论

本研究建立了固相萃取-液相色谱-串联质谱快速检测海洛因及其代谢产物的方法,可实

现 4 种药物在 10 min 内的快速检测。该方法的抗干扰能力强、检测速度快,具有保留时间和串联质谱特征离子对确证的优点;且定量准确、灵敏度高,能满足同时检测海洛因、3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡和 O^6 -单乙酰吗啡 4 种药物的要求。



注:a. 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡;b. 吗啡;c. O^6 -单乙酰吗啡

图 2 案件 2 的总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion chromatogram of case two

参考文献:

- [1] 钟大放. 药物代谢[M]. 北京:中国医药科技出版社,1995:8-13.
- [2] 吕海茹. 尿中吗啡常见检测方法[J]. 刑事技术, 2008,(2):29-31.
LV Hairu. Detection of morphine in urine[J]. Forensic Science and Technology, 2008,(2): 29-31(in Chinese).
- [3] 姬晓新. 血中吗啡的 GC-MS 检验[J]. 分析测试学报,2004,23(9):35-36.
JI Xiaoxin. GC-MS test morphine in blood[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2004, 23(9): 35-36(in Chinese).
- [4] 何国标,蒋硕勤,罗正坚. 吗啡类毒品的固相萃取-气质联用法测定[J]. 分析测试学报,2008,27(增刊):11-12.
HE Guobiao, JIANG Shuoqin, LUO Zhengjian. Determination of morphine-type drugs in urine by SPE/GC-MS[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2008, 27(Suppl): 11-12(in Chinese).
- [5] 蔡锡兰,吴国萍. 膜提取气相色谱/质谱大体积进样检测海洛因吸食者尿液中的代谢物[J]. 分析化学,2002,30(1):126.
CAI Xilan, WU Guoping. Determination of heroin metabolites in urine of addicts by using the solid phase membrane extractor and GC/MS large-volume injection method[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2002, 30(1): 126(in Chinese).
- [6] GHAZI-KHANSARI M, ZENDEHDEL R, PIRALI-HAMEDANI M, et al. Determination of morphine in the plasma of addicts in using Zeolite Y extraction following high-performance liquid chromatography [J]. Clinica Chimica Acta, 2009, 364(1/2): 235-238.
- [7] 张小婷. 超高效液相色谱法(UPLC)同时筛选检测吗啡等7种常见毒品[J]. 刑事技术,2008,(6):11-12.
ZHANG Xiaoting. The analysis of common abuse drugs by UPLC simultaneously[J]. Forensic Science and Technology, 2008,(6): 11-12(in Chinese).
- [8] TAYLOR K, ELLIOTT S. A validated hybrid quadrupole linear ion-trap LC-MS method for the analysis of morphine and morphine glucuronides applied to opiate deaths[J]. Forensic Science International, 2009, 187(1/2/3): 34-41.
- [9] SVENSSON J O, ANDERSSON M, GUSTAVSSON E, et al. Electrospray LC-MS method with solid-phase extraction for accurate determination of morphine, codeine, and ethylmorphine-glucuronides and 6-acetylmorphine in urine[J]. Anal Toxicol, 2007, 31(2): 81-86.
- [10] 梁晨,叶海英,张玉荣,等. 吸毒者尿样中 3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、O⁶-单乙酰吗啡、可待因的 LC-MS/MS 分析[J]. 质谱学报,2010, 31(2): 224-227.
LIANG Chen, YE Haiying, ZHANG Yurong, et al. Determination of morphine-3-β-D-glucuroinde, morphine, O⁶-monoacetylmorphine and codeine in heroin addicts' urine by LC-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2010, 31(2): 224-227(in Chinese).
- [11] 王俊伟,郭亚飞,王绘军,等. 葡萄糖醛酸吗啡的 LC-MS/MS 检验方法研究[J]. 分析测试学报, 2007,26(9):130-134.
WANG Junwei, GUO Yafei, WANG Huijun, et al. A study on the determination method of morphine glucuronide by HPLC-MS/MS [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2007, 26(9): 130-134(in Chinese).
- [12] 梁晨,叶海英,张玉荣,等. 柱切换 LC-MS/MS 分析吸毒者尿样中的吗啡、O⁶-单乙酰吗啡、可待因、乙酰可待因[J]. 质谱学报,2011,32(3):159-163.
LIANG Chen, YE Haiying, ZHANG Yurong, et al. Determination of morphine, O⁶-monoacetylmorphine, codeine and acetylcodeine in heroin addicts' urine by on-line solid-phase extraction liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2011, 32(3): 159-163(in Chinese).