

生物检材中 59 种滥用药物的 LC-MS/MS-MRM 分析

向 平, 沈 敏, 沈保华, 马 栋, 卓先义

(司法部司法鉴定科学技术研究所, 上海 200063)

摘要: 针对滥用药物分析鉴定实践中急待解决的问题, 建立生物检材中 59 种滥用药物的液相色谱-串联质谱-多反应监测(LC-MS/MS-MRM)分析方法。生物检材包括血液、尿液和毛发等, 样品前处理简便、快速。建立 LC-MS/MS 数据库和定性认定准则, 方法包括筛选和确证分析, 筛选方法的 LOD 在 0.1~10 ng/mL 范围, 其中 73% 目标物的 LOD \leq 0.1 ng/mL。方法的应用范围广、特异性强、灵敏度高, 并且已在实践中得到了验证。

关键词: 液相色谱-串联质谱-多反应监测(LC-MS/MS-MRM); 滥用药物; 生物检材; 筛选; 确认
中图分类号: O657.63; R917 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2006)04-237-05

Simultaneous Screening for 59 Drugs of Abuse in Biological Samples by LC-MS/MS-MRM

XIANG Ping, SHEN Min, SHEN Bao-hua, MA Dong, ZHUO Xian-yi

(*Institute of Forensic Sciences, Ministry of Justice, P. R. China, Shanghai 200063, China*)

Abstract: A method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring (LC-MS/MS-MRM) was developed for the simultaneous screening of 59 drugs of abuse in the body specimens to cover the problem in forensic toxicology. The biological samples including blood, urine and hair were prepared simply and rapidly. The MRM database and criteria for identification were established. The screening method was followed by confirmation procedure and the limits of detection ranged from 0.1 to 10 ng/mL (LOD for 73% of the drugs \leq 0.1 ng/mL). The method was sufficiently selective and sensitive to detect illicit drugs and applied in forensic casework.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring (LC-MS/MS-MRM); drugs of abuse; biological samples; screening; confirmation

滥用药物(drugs of abuse)是指连续使用后产生依赖性, 并具有滥用倾向的精神活性物质^[1]。滥用药物分析是毒物分析专业非常重要、所占比重很大的一部分。目前, 滥用药物多数是

采用气质联用仪(GC/MS)分析, 但由于滥用药物经体内代谢后, 代谢物一般极性增强, 必须衍生化才能进行 GC/MS 分析, 前处理繁琐、费时。液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)的出现解决了

这些问题^[2-7], LC-MS/MS 近年来得到了迅速发展。LC-MS/MS 可以直接分析不挥发性化合物、极性化合物、热不稳定化合物和大分子化合物, 分析范围广, 而且不需生化步骤, 样品前处理简便。采用多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 更可大大提高分析的专一性和灵敏度。另外, 滥用药物分析目前多采用含量相对较高的尿液, 但新形势下要求更科学更严谨的方法。如吸毒死亡案件中血液的定量分析; 交通事故中涉嫌服药后驾驶者的血液和唾液分析; 毛发中的痕量滥用药物分析等。本文根据这些鉴定实践中急待解决的问题, 开展生物检材中滥用药物的 LC-MS/MS 分析。

1 试验部分

1.1 主要仪器和试剂

液相三重四极串联质谱联用仪 API 4000 LC-MS/MS (美国 Applied Biosystems 公司)。62 种滥用药物及其代谢物和氘代内标均来源于 Cerilliant 公司、Sigma 公司和国家麻醉品实验室。甲酸和乙酸胺来源于 Fluka 公司, 乙腈购于 Sigma 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 LC/MS 条件

1.2.1 色谱条件 液相柱: Allure PFP Propyl 5 μm 100 \times 2.1 mm (Resteck 公司), 接 phenomenex 保护柱; 流动相为乙腈-缓冲液 (70 : 30), 缓冲液为 20 mmol/L 乙酸胺和 2% 甲酸的

溶液; 恒流 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

1.2.2 质谱条件 电喷雾电离-正离子模式 (ESI+); 碰撞气 (CAD): 7; 气帘气 (CUR): 30 psi; 离子喷射电压 (IS): 5 500 V; 雾化气温度 (TEM): 500 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 样品前处理方法

1.3.1 体液提取法 血液、尿液或唾液 1 mL 中加入 2 mL pH 9.2 磷酸缓冲液, 加入 3.5 mL 乙醚, 混旋, 离心, 取有机层, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中挥发至干, 残余物中加入 100 μL 流动相, 取 5 μL 进样。

1.3.2 头发 头发段依次用 0.1% 十二烷基磺酸钠、0.1% 洗洁精、蒸馏水、丙酮洗涤, 晾干后剪成约 1 mm 长, 备用。空白头发同法处理。头发 20 mg 加入 1 mL 0.1 mol/L HCl 浸泡过夜, 取出后用 1 mol/L NaOH 调至中性, 加入 2 mL pH 9.2 磷酸缓冲液, 同 1.3.1 处理。

2 结果与讨论

2.1 方法的建立与评价

本方法中的滥用药物包括阿片类、苯丙胺类、可卡因等兴奋剂, 大麻酚类、苯二氮卓类安眠镇静类药物等共 59 种, 并采用甲基苯丙胺-d5、氯胺酮-d4 和 morphine-d3 作为内标。以两个母离子-子离子对和保留时间建立目标物的 LC-MS/MS 数据库, 59 种滥用药物和 3 个氘代内标以及 MS/MS 条件和保留时间见表 1。

表 1 59 种滥用药物的 LC-MS/MS 数据库
Table 1 LC-MS/MS database for 59 drugs of abuse

中文名 Chinese name	英文名 English name	筛选 Q1/Q3 Q1/Q3 for screening	确证 Q1/Q3 Q1/Q3 for confirmation	去簇电压 DP/V	碰撞电压 CE/eV	保留时间 t_R/min	最低检测限 LOD/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
去甲麻黄碱	norephedrine	134.2/115.1	134.2/91.1	70	31	3.85	0.1
苯丙胺	amphetamine	136.1/119.1	136.1/91.1	40	21	5.12	0.1
甲基苯丙胺	methamphetamine	150.1/119.1	150.1/91.1	30	16	6.07	0.1
甲基苯丙胺-d5	methamphetamine-d5	155.2/91.1	155.2/121.1	40	23	6.09	0.1
尼古丁	nicotine	163.2/130.2	163.2/117.1	30	30	4.59	0.1
麻黄碱	ephedrine	166.1/148.1	166.1/133.1	40	18	4.65	0.1
可铁宁	cotinine	177.2/101.2	177.2/80.2	30	11	1.73	0.1
亚甲基双氧苯丙胺	MDA	180.1/163.1	180.1/135.1	40	15	5.01	0.1
爱康宁	ecognine	186.2/168.3	186.2/82.2	57	25	1.3	1
亚甲基双氧甲基苯丙胺	MDMA	194.2/163.4	194.2/135.3	35	18	5.93	0.1
甲基双氧苯基丁胺	BDB	194.2/135.3	194.2/177.2	50	19	5.81	0.1
咖啡因	caffeine	195.2/138.2	195.2/110.0	50	29	2.86	0.1
爱康宁甲酯	ecognine ester	200.2/182.2	200.2/82.2	52	25	3.83	1

续表

中文名 Chinese name	英文名 English name	筛选 Q1/Q3 Q1/Q3 for screening	确证 Q1/Q3 Q1/Q3 for confirmation	去簇电压 DP/V	碰撞电压 CE/eV	保留时间 t_R /min	最低检测限 LOD/ (ng · mL ⁻¹)
乙基二甲氨基苯丙胺	MDE	208.2/163.3	208.2/135.3	50	19	6.81	0.1
N-甲基-1-(3,4-甲基双氧苯基)-2-丁胺	MBDB	208.3/177	208.3/135.3	50	15	6.88	0.1
去甲氯胺酮	norketamine	224.1/207.1	224.1/125.1	40	19	3.54	0.1
芬氟拉明	fenflutamine	232.2/159.3	232.2/187.3	20	32	10.38	0.1
去甲度冷丁	normeperidine	234.2/160.3	234.2/91.1	75	23	8.32	0.1
氯胺酮	ketamine	238.1/179.1	238.1/125.1	40	25	5.3	0.1
氯胺酮-d4	ketamine-d4	242.2/183.1	242.2/129.2	40	26	5.31	0.1
度冷丁	meperidine	248.3/220.3	248.3/174.1	50	30	8.49	0.1
7-氨基硝基安定	7-aminonitrazepam	252.2/121.1	252.2/146.2	80	37	1.5	1
曲马多	tramadol	264.2/58.0	264.2/246.2	50	37	7.4	0.1
去甲安定	nordiazepam	271.2/140.2	271.2/208.1	70	36	2.04	1
美沙芬	dexmethorphanum	272.3/147.2	272.3/213.3	60	42	11.34	0.1
2-亚乙基-1,5-二甲基-3,3-联苯吡啶	EDDP	278.2/234.3	278.2/249.3	70	41	9.82	1
硝基安定	nitrazepam	282.2/236.2	282.2/180.2	70	32	1.89	1
7-氨基氟硝基安定	7-aminoflunitrazepam	284.2/135.2	284.2/226.2	80	39	1.7	0.1
安定	diazepam	285.1/193.3	285.1/0154.1	80	45	2.51	0.1
吗啡	morphine	286.1/201.2	286.1/165.3	80	36	3.08	0.1
氢吗啡酮	hydromorphone	286.2/185.3	286.2/199.1	85	40	5.2	1
去甲氧安定	demoxepam	287.1/269.3	287.1/180.2	70	38	1.92	1
羟基安定	oxazepam	287.2/241.2	287.2/269.3	50	31	1.77	1
吗啡-d3	morphine-d3	289.2/201.1	289.2/165.3	80	35	3.08	0.1
艾司唑仑	estazolam	295.2/267.3	295.2/205.2	70	34	2.09	1
可待因	codeine	300.2/199.2	300.2/165.3	80	40	4.01	0.1
二氢可待因酮	hydrocodone	300.2/199.2	300.2/171.3	80	40	5.2	0.1
甲羟安定	temazepam	301.2/255.2	301.2/283.1	70	36	1.21	0.1
可卡因	cocaine	304.1/182.2	304.1/150.2	60	28	10.08	0.1
阿普唑仑	alprazolam	309.1/281.1	309.1/274.2	80	33	2.62	0.1
美沙酮	methadone	310.2/265.2	310.2/105.1	50	22	6.84	0.1
大麻酚	CBN	311.2/223.2	311.2/293.1	60	29	6.92	10
蒂巴因	thebaine	312.2/58.2	312.2/266.2	60	38	6.94	0.1
氟硝基安定	flunitrazepam	314.2/268.3	314.2/239.3	85	35	2.2	0.1
四氢大麻酚	THC	315.2/193.2	315.2/259.2	60	32	6.78	10
大麻二酚	CBD	315.2/193.2	315.2/105.2	60	32	4.45	10
羟可待酮	oxycodone	316.2/298.1	316.2/241.1	80	27	4.4	0.1
氯硝基安定	clonazepam	316.2/270.1	316.2/214.1	75	36	1.89	0.1
古柯乙烯	cocaethylene	318.2/196.2	318.2/150.2	61	26	11.94	10
劳拉西洋	lorazepam	321.1/275.1	321.1/303.1	60	30	1.73	0.1
α -羟基阿普唑仑	α -hydroxyalprazolam	325.2/297.2	325.2/279.2	90	35	1.77	1
咪唑唑仑	midazolam	326.2/291.4	326.2/244.2	65	37	4.09	0.1
单乙酰吗啡	6-acetylmorphine	328.1/211.3	328.1/165.3	90	36	4.24	0.1
帕罗克赛	paroxetine	330.3/192.3	330.3/70.1	60	28	10.41	11
芬太尼	fentanyl	337.2/188.3	337.2/105.2	70	31	10.59	0.1
罂粟碱	papaverine	340.1/202.2	340.1/324.3	60	37	4.19	0.1
右丙氧芬	propoxyphene	340.2/266.2	340.2/58.1	30	12	2.79	1
乙酰可待因	acetylcodeine	342.2/225.2	342.2/165.3	85	35	6.3	0.1
三唑仑	triazolam	343.2/308.2	343.2/315.2	80	36	2.42	0.1
α -羟基三唑仑	α -hydroxytriazolam	359.2/331.2	359.2/176.1	80	38	1.73	0.1
海洛因	heroin	370.2/268.2	370.2/165.0	90	38	5.91	0.1
那可汀	norcotine	414.2/220.3	414.2/353.2	60	32	4.52	0.1

本方法包括两个步骤,首先进行筛选分析,然后是确证分析。筛选分析选取一对滥用药物的母离子-子离子,而确证分析选取两对。筛选分析若出现可疑色谱峰,可通过 LC-MS/MS 库检索提供可能的化合物,在此基础上用已建立的各类化合物的更灵敏、更特异性的方法进行确认,包括增加至两个母离子-子离子对,更换流动相或液相柱等。

LC-MS/MS 定性准则参照国际兴奋剂检测标准 WADA TD2003IDCR 文件^[8] 制订如下:(1)目标物与标准对照品保留时间误差小于 $\pm 2\%$ 或 ± 0.4 min;(2)目标物的两个母离子-子离子对峰面积的比率与标准对照品的两个母离子-子离子对峰面积的比率相对误差小于 $\pm 15\%$ 。定性认定的前提是目标物与标准对照品的浓度相匹配,如果浓度过高出现超载,则应稀释后重新进样。

选取其中 4 种滥用药物考察方法的有效性。空白血液中加入目标物和 10 ng 氯胺酮-d4 内标物,以目标化合物峰面积与内标峰面积的比值对浓度作线性回归,结果在 0.1~100 ng/mL 范围内浓度与面积比值均成良好的线性关系(见表 2)。最低检出限(LOD)以空白血液添加目标物(混合物)的峰强度信噪比(S/N)大于 3 确定,结果见表 1。

表 2 滥用药物的线性及精密度

Table 2 Calibration curve and precision for drugs of abuse

药物	线性方程	R ²	CV (10 ng/mL, n=4)
MDMA	$y=0.411x+1.26$	0.994 7	6.22
美沙酮	$y=5.64x+9.52$	0.997 3	4.93
氯胺酮	$y=1.11x+1.05$	0.998 1	5.23
可待因	$y=0.458x-0.09$	0.998 3	9.76

2.2 讨论

本方法中采用电喷雾电离-正离子模式灵敏度高。筛选方法的 LOD 在 0.1~10 ng/mL 范围,其中 73% 目标物的 LOD ≤ 0.1 ng/mL, 20% ≤ 1 ng/mL, 只有 7% ≤ 10 ng/mL, 足以满足法医毒物学和临床毒物学检测生物检材中滥用药物的要求。确证分析时,由于检测指标为两个母离子-子离子对,离子驻留时间由筛选分析的 10

ms 增加为 200 ms,液相分离更为优化使离子抑制进一步减少,使方法的灵敏度较筛选分析提高数倍至数十倍以上。

巴比妥类药物和四氢大麻酚(THC)的体内代谢物四氢大麻酸(THC-COOH)等滥用药物呈酸性,采用负离子模式灵敏度高。LC-MS/MS 在一次进样流程中可进行正离子模式和负离子模式转换,理论上可同时分析酸性、中性和碱性滥用药物,但是由于受到 LC/MS 色谱柱、流动相等条件的限制,所以,本方法中不包括巴比妥类药物和 THC-COOH 等酸性药物的分析。

采用串联质谱分析,各类滥用药物在碰撞池内裂解产生其特征性碎片离子。阿片类生物碱如海洛因、单乙酰吗啡、吗啡、可待因等有相同子离子 m/z 165; 苯丙胺类兴奋剂有相同子离子 m/z 91、135; 氯胺酮及其代谢物有相同子离子 m/z 125; 苯二氮卓类药物有相同的中性丢失 m/z 18、28、35、46、131、183; 可卡因及其代谢物有相同子离子 m/z 82、150、168、182 和相同的中性丢失 m/z 18、122 等。利用此相同的裂解规律,笔者认为可以建立以子离子和中性丢失为目标物的筛选分析方法,由此扩大滥用药物筛选的范围。

2.3 案例应用

2.3.1 案例 1 某公安分局送检头发样本,委托苯丙胺类药物和氯胺酮分析。但是经过去污处理、水解和提取后,GC/MS 分析呈阴性。将提取残余物中加入流动相,采用 LC-MS/MS 分析,则检出甲基苯丙胺、氯胺酮和去甲氯胺酮(见图 1)。GC/MS 分析甲基苯丙胺时,灵敏度低,提高灵敏度必须衍生化。但另一方面,苯丙胺类化合物低分子质量,易挥发,衍生化又必须在无水条件下^[1]。所以,在样品前处理需要挥干时,加入 1% 盐酸甲醇以防止它们在吹干时损失,但这样增加了 GC/MS 风险,因为如果吹不干就可能对毛细管柱造成危害。而采用 LC-MS/MS 则无需衍生化,前处理简便、快速。

2.3.2 案例 2 某老人自杀,其血液样本经 GC/MS 和 GC/ECD 分析,结果呈阴性。应用所建立的 LC-MS/MS 筛选、确证(见图 2)并定量,在血液中检出氯硝安定和帕罗克赛,浓度分别为 17.8 ng/mL 和 93.4 ng/mL。帕罗克赛是一种强效的选择性血清素再回收抑制剂,可有效治疗泛焦虑症,为含氟化合物,气相分析的检测器多

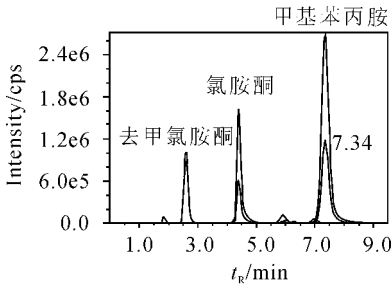


图 1 案例 1 头发的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of the hair sample obtained from case 1

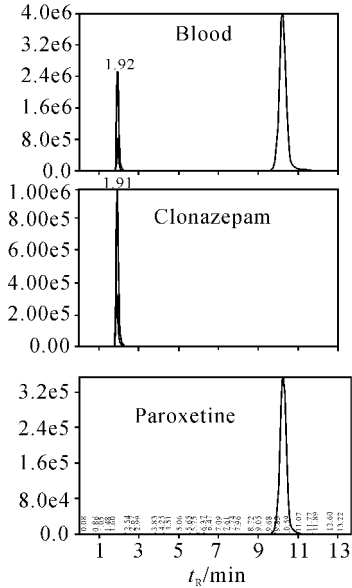


图 2 案例 2 中血液检材和对照品的 MRM 图

Fig. 2 MRM chromatograms obtained from blood specimen and standards in case 2

采用负离子化学电离质谱。而氯硝安定的 GC/MS 和 GC/ECD 分析灵敏度很差。

3 结 论

建立了同时分析 59 种滥用药物的方法、简

便、快速、特异性强、灵敏度高、分析范围广。本方法不仅适用于血液、尿液和毛发等多种生物检材,而且可用于筛选、确证和定量,并且已在实践中得到了验证。

参考文献:

- [1] 沈 敏. 体内滥用药物分析[M]. 北京:法律出版社,2003:66-238.
- [2] Maciej J, Bogusz. Liquid Chromatographic-Mass Spectrometry as a Routine Method in Forensic Sciences: a Proof of Maturity[J]. J Chromatogr, 2000, 748: 3-19.
- [3] Jan F Van Bocxlaer, Karine M Clauwaert, Willy E Lambert, et al. Liquid Chromatographic-Mass Spectrometry in Forensic Toxicology [J]. Mass Spec Rev, 2000,19: 165-214.
- [4] Anniek Schellen, Bert Ooms, Dick van de Lage-maat, et al. Generic Solid Phase Extraction-Liquid Chromatographic-Tandem Mass Spectrometry Method for Fast Determination of Drugs in Biological Fluids [J]. J Chromatogr, 2003, 788: 251-259.
- [5] Kikura-Hanajiri R, Kaniwa N, Ishibashi M, et al. Liquid Chromatographic-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometric Analysis of Opiates and Metabolites in Rat Urine after Inhalation of Opium [J]. J Chromatogr, 2003, 789: 139-150.
- [6] Gergov M, Ojanpera I, Vuori E. Simultaneous Screening for 238 Drugs in Blood by Liquid Chromatography-Ionspray Tandem Mass Spectrometry with Multiple-reaction Monitoring [J]. J Chromatogr B, 2003, 795: 41-53.
- [7] Robert Kronstrand, Ingrid Nystrom, Joakim Strandberg, et al. Screening For Drugs of Abuse in Hair with Ion Spray LC-MS-MS [J]. Forensic Sci Int, 2004, 145: 183-190.
- [8] 国际兴奋剂检测标准 WADA TD2003IDCR, <http://www.wada-ama.org/cn>