【化学测定方法】

固相萃取 - 高效液相色谱法同时测定血浆中甲基苯丙胺和苯丙胺

朱波

(浙江省宁波市微循环与莨菪类药研究所,浙江宁波 315010)

[摘要] 目的:建立快速、准确的血浆中甲基苯丙胺(MA)及其代谢产物苯丙胺(AMP)的固相萃取高效液相色谱测定方法。方法:血浆样品中的 MA 和 AMP 经固相萃取小柱富集净化后,在 XBridge RP18 色谱柱上,以甲醇 - 乙腈 - 水溶液(10:15:75,V/V/V)为流动相,采用 210 nm 波长进行检测。结果:MA 和 AMP 的加标回收率在 90.6% ~97.5% 范围,其相对标准偏差均小于 5.0%,在 0.1 mg/L ~15.0 mg/L 范围呈现良好的线性,其回归系数大于 0.999,检出限(LODs)分别为 0.01 mg/L 和 0.02 mg/L。结论:本方法简便、灵敏、准确,能满足临床吸毒病人血浆中 MA 和 AMP 的检测要求。

[关键词] 液相色谱法;甲基苯丙胺;苯丙胺;血浆;固相萃取

[中图分类号] O657.7+2 [文献标识码] A [文章编号] 1004 - 8685(2011)07 - 1637 - 03

Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in plasma by solid phase extraction - HPLC method

ZHU Bo

(Ningbo Institute of Microcirculation and Henbane, Ningbo 315010, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for the simultaneous determination of methamphetamine (MA) and amphetamine (AMP) in plasma by high - performance liquid chromatography with solid - phase extraction (SPE). **Methods:** After the target analytes in plasma were extracted and purified by a solid - phase extraction cartridge, the sample was separated on an XBridge RP18 column by a mobile phase consisting of methanol - acetonitrile - water (10:15:75, V/V/V). Detection was carried out by an ultraviolet detector at 210 nm. **Results:** Calibration curves of MA and AMP were in good linear within the range of 0.1 mg/L ~15.0 mg/L with regression coefficient more than 0.999. The limits of detection (LODs) were 0.01 mg/L and 0.02 mg/L for MA and AMP, respectively. The extraction recoveries were between 90.6% ~97.5%, and the RSDs were less than 5.0%. **Conclusion:** This developed method is simple, sensitive and accurate. It is suitable for the detection of MA and AMP residues in the drug abuse patients of clinical diagnoses.

[Key words] High - performance liquid chromatography; Methamphetamine; Amphetamine; Plasma; Solid - phase extraction

甲基苯丙胺(methamphetamine, MA)及其主要活性代谢产物苯丙胺(amphetamine, AMP)均为具有兴奋中枢神经作用的苯丙胺类物质(结构式见图 1),是近年来滥用药物"摇头丸"的常见成分[1]。文献报道[2]吸食 MA 极易成瘾,长期服用可产生耐受性和依赖性,服用 0.1 g 可明显中毒,超过 1 g 可致死,成人一次服用 AMP 30 mg 以上可出现中毒反应,最小致死量为 200 mg,中毒浓度为 0.5 mg/L。在涉嫌吸毒病人中,血浆中是否含有 MA 和 AM P 是判断其是否吸毒的重要依据,因此,对 MA 和 AMP 进行准确测定十分重要。

目前,国内外关于 MA 与 AMP 的检测方法主要有气质联用法[3~5]、气相色谱法[6]、毛细管电泳色谱法[7]、高效液相色谱法[8~11]等。由于 MA 和 AMP 分子量较小,且含有一个氨基,在气相色谱中表现为和溶剂峰保留时间接近,峰形较差,常需进行衍生化处理,操作相对复杂。文献报道的高效液相色谱法都存在分析时间长,基质干扰较大等问题,不适于实验室毒物分析的实际工作需求。液相色谱在基层实验室已得到了广泛的应用[12~16],本研究在参考有关文献[3~11]的基础上,采用通用型的紫外检测器,利用固相萃取技术,建立了较为简便、快速、准确的 MA 与 AMP 的反相高效液相色谱测定方法,可为吸毒病人的临床诊断提供科学的依据。

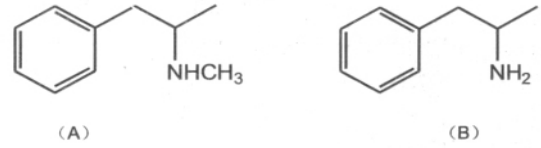


图 1 甲基苯丙胺(A)和苯丙胺(B)结构式

1 实验部分

1.1 试剂与材料

甲醇和乙腈均为 HPLC 级(德国 Merck 公司);甲基苯丙胺和苯丙胺对照品(含量 >99.0%,Chem Service 公司);所有的溶剂使用前均用 0.45 μm 滤膜过滤;盐酸和氨水(均为分析纯,上海化学试剂集团公司);2 ml 聚丙烯离心管;空白血浆采自 3 位年龄在 20 岁 ~25 岁的健康志愿者(其中 2 位为男性,1

[作者简介] 朱波(1970 -),男,本科,副主任技师,主要从事微生物与生化检验,药理学实验,药物依赖防治与机制研究。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

位为女性)；实验用水均来自 Milli－Q 纯水系统。

甲基苯丙胺和苯丙胺标准贮备液(1.0 mg/ml)：分别准确称取 10.0 mg 甲基苯丙胺和苯丙胺标准品于 2 个 10 ml 容量瓶中，分别用少量甲醇溶解后，用甲醇定容至刻度。

1.2 仪器

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪，包括四元泵、在线真空脱气机、紫外可见检测器、柱温箱、自动进样器及 Chemical Station 化学工作站(美国 Agilent 公司)；全玻璃溶剂过滤器(美国 Waters 公司)；Legend RT 型离心机(德国 Heraeus 公司)；SB25－12D 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技有限公司)；HGC－24 型氮吹仪(天津恒奥科技有限公司)；12 孔固相萃取仪；Waters Oasis® MCX 固相萃取小柱(3 ml/60 mg)；Milli－Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.3 色谱条件

色谱柱：XBridge™ Shield RP18 柱(250 mm × 3.0 mm × 5 μm)；流速：1.0 ml/min；柱温：35℃；流动相：流动相为甲醇－乙腈－水溶液(10∶15∶75，V/V/V)；检测波长为 210 nm，进样体积：20 μl。

1.4 样品处理

取血浆 1.0 ml，置于 2 ml 聚丙烯离心管中，加入 0.2 mol/L 盐酸溶液 0.5 ml，旋涡振荡 1 min 后，以 8000 r/min 离心 5 min，上清液加入预先处理好的萃取小柱中(预先用 2.0 ml 甲醇和 1.0 ml 蒸馏水活化小柱)，以 1.0 ml/min 的流速通过小柱，抽干后，分别以 1.0 ml 甲醇(含 0.05 mol/L 盐酸)和 1.0 ml 5% 氨水/甲醇(60/40，V/V)淋洗杂质，然后再用 1.0 ml 含 5% 氨水/甲醇(10/90，V/V)溶液洗脱待测物，洗脱速度控制在 0.5 ml/min 以下。收集洗脱液，在 40℃ 水浴上用氮吹仪浓缩至干，残渣用 100 μl 流动相溶解后，取 20 μl，注入 HPLC 进行测定。

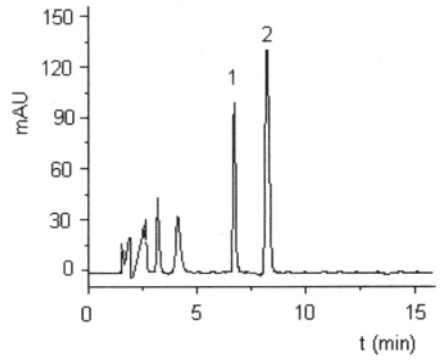
2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 检测波长的选择 采用 1.0 mg/L 的 MA 和 AMP 标准溶液，在 190 nm～400 nm 波长范围内进行在线扫描，结果表明，MA 和 AMP 均在 206 nm 波长处有最大吸收，在 206 nm～230 nm 范围吸光度呈下降趋势。本试验选择 210 nm 波长进行检测。

2.1.2 色谱柱的选择 近年来，反相 HPLC 法应用于 MA 和 AMP 分析方面已有一定的报道，文献[10,11,12]采用 CLC C_8 柱(150 mm × 5.0 mm × 5 μm)，Diamonsil C_{18} 柱(150 mm × 4.6 mm × 5 μm)和 XR－ODS 柱(75 mm × 2.0 mm × 2.2 μm)进行分离，前两种柱子从文献报道的结果看，MA 和 AMP 的分离情况均不是十分理想，要么保留时间偏长，要么分离度偏低，而 XR－ODS 柱为快速分离柱，需配置快速液相色谱系统，不然的话，难以实现快速的色谱分离。本文试验了 XBridge™ RP18 色谱柱，发现其分离效果明显好于 CLC C_8 柱和 Diamonsil C_{18} 柱，采用甲醇－乙腈－水溶液(10∶15∶75，V/V/V)为流动相，等度洗脱，其分离度大于 1.5，而且与杂质能达到较好的分离，见图 2。本文选用 XBridge™ RP18 色谱柱进行试验。

2.1.3 流动相的优化 本文考察了三种流动相对 MA 和 AMP 分离效果和色谱峰形的影响，分别是含乙腈－甲醇－25 mmol/L 的磷酸二氢钾缓冲液[10]，甲醇－25 mmol/L 的磷酸二氢钾缓冲液[11]，甲醇－乙腈－水溶液。结果表明，以甲醇－乙腈－水溶液为流动相进行适度的比例调整，当其体积比为 10∶15∶75 时，MA 和 AMP 能达到较好的分离，其分离度大于 1.5，峰形尖锐，保留时间适宜，而且不含无机盐，此时苯丙胺的保留时间为 6.11 min，甲基苯丙胺的保留时间为 8.01 min。而采用乙腈－甲醇－25 mmol/L 的磷酸二氢钾缓冲液和甲醇－25 mmol/L 的磷酸二氢钾缓冲液，这两个流动相在 XBridge RP18 色谱柱上，虽然调节两相的比例，可以得到较好的分离度，但色谱峰拖尾，保留时间较长，不是十分适宜于血浆中 MA 和 AMP 的检测需求。本研究选择甲醇－乙腈－水溶液(10∶15∶75，V/V/V)为流动相。



1－苯丙胺 t_R = 6.11 min；2－甲基苯丙胺 t_R = 8.01 min

图 2 空白血浆加标样品的色谱图

2.2 固相萃取条件的选择

2.2.1 固相萃取小柱的选择 由于检测的目标组分 MA 和 AMP 具有胺基，呈碱性，在反相色谱填料上保留较弱，很难利用一般的固相萃取小柱与基质达到分离净化目的。文献[10]报道采用通用型的 Oasis® HLB 小柱进行富集净化，结果发现其净化效果不是十分理想，色谱图中出现了较多的杂峰。为此，本文选择了兼容阳离子交换与反相色谱的 Oasis® MCX 固相萃取小柱来对样品进行净化富集，获得了较好的效果。

2.2.2 净化、洗脱条件优化 试验发现，仅采用液液萃取，即使采用不同的溶剂如乙醚、氯仿和乙酸乙酯等，不管血样碱化或酸化与否，基质干扰很难除去，色谱图中出现较多杂峰，干扰结果分析，为此本文采用固相萃取进行富集净化。本文试验了各种固相萃取条件，为了使目标化合物能在固相萃取小柱上得到最好的保留，上样之前需对血浆样品进行适当的酸化。经试验，当血浆中加入适量的盐酸后，其中的 MA 和 AMP 转变为阳离子，这样易被 Oasis® MCX 固相萃取小柱交换吸附，本文选择在 1.0 ml 血浆中加入 0.2 mol/L 盐酸溶液 0.5 ml 进行酸化，以确保血浆中的 MA 和 AMP 分子全部转变为阳离子。为尽可能减少基体干扰，选择性地除去干扰物，本试验选择采用酸化甲醇酸洗和氨水甲醇溶液碱洗两个淋洗步骤，但由于 MA 和 AMP 易与酸形成易溶于水的盐，在试验时必需考虑酸化甲醇的用量及浓度，否则易造成流失，而使回收率偏低。本文试验了不同酸化甲醇用量(0.5 ml、1.0 ml、1.5 ml 和 2.0 ml)对回收率的影响。结果发现当 0.05 mol/L 的酸化甲醇用量超过 1.5 ml 时，MA 和 AMP 的回收率小于 80%，当用量为 1.0 ml 时，提取回收率大于 90%，色谱图中杂质干扰少，操作简单、快速。本文选择酸化甲醇中盐酸浓度为 0.05 mol/L，用量为 1.0 ml。同样，试验结果显示当甲醇中 5% 氨水的比例达到 50% 时，在淋洗液中就能检测到被测化合物，

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

试验选择碱洗溶液为甲醇/5% 氨水(40∶60, V/V),用量为 1.0 ml。

本文试验了各种比例的 5% 氨水与甲醇溶液对目标化合物洗脱能力的影响。甲醇比例小于 50% 时,目标化合物难以洗脱,当溶液中甲醇比例增大时,其洗脱能力也随之增大,当甲醇比例达到 70% 时,可达到完全洗脱。为此,本试验选用洗脱液的甲醇浓度为 90%,其用量为 1.0 ml,这样既能保证目标化合物的完全洗脱,又能使碱性的干扰物保留在柱子上不干扰测定。

2.3 线性范围及检出限

准确吸取浓度为 1.0 mg/ml 的 MA 和 AMP 各 1.0 ml 于 10 ml 容量瓶中,用甲醇定容至 10 ml,此混合中间液的浓度为 0.10 mg/ml。分别吸取混合中间液 0.005 ml、0.01 ml、0.02 ml、0.05 ml、0.1 ml、0.2 ml、0.5 ml 和 1.5 ml 用甲醇定容至 10 ml,配成浓度分别为 0.05 mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L、5.0 mg/L 和 15.0 mg/L 的标准溶液系列。按所述的色谱条件进样 20 μl 进行分析,获得不同质量浓度下各组分的峰面积,以质量浓度(C,mg/L)对峰面积(A)进行线性回归,结果见表 1。由表 1 可知,MA 和 AMP 在 0.1 mg/L ~ 15.0 mg/L 范围均具有良好的线性,其相关系数均大于 0.999。同时采用不含 MA 和 AMP 的空白样品进行检测,按色谱峰高为噪声高 3 倍(S/N = 3)相对应的浓度为检出限,血浆中 MA 和 AMP 的检出限分别为 0.01 mg/L 和 0.02 mg/L。

表 1 MA 和 AMP 的线性范围、线性方程、相关系数和检出限

化合物	线性范围 (mg/L)	线性方程	相关系数 (*r*)	检出限 (mg/L)
MA	0.1 ~ 15.0	A = 168.13C + 1.92	0.9991	0.01
AMP	0.1 ~ 15.0	A = 129.56C + 1.63	0.9995	0.02

2.4 方法的回收率与精密度

取空白血浆样品,加入一定量的 MA 和 AMP 标准溶液,使血浆中 MA 和 AMP 的浓度为 0.10 mg/L、0.50 mg/L 和 1.20 mg/L,然后按 1.4 方法处理,进样分析,平行测定 6 次,计算其回收率,结果见表 2。由表 2 可知,MA 和 AMP 的回收率在 90.6% ~ 97.5% 范围,*RSD* 均小于 5.0%,方法具有较好的精密度与回收率。

表 2 回收率与精密度试验

化合物	加入量(mg/L)	测定值 (mg/L)	回收率(%)	*RSD* (%)
MA	0.10	0.094 ± 0.003	94.0	3.2
	0.50	0.453 ± 0.015	90.6	3.3
	1.20	1.172 ± 0.050	97.5	4.3
AMP	0.10	0.093 ± 0.004	93.0	4.3
	0.50	0.464 ± 0.022	92.8	4.7
	1.20	1.131 ± 0.055	94.2	4.9

3 结论

建立的固相萃取高效液相色谱法同时测定血浆中 MA 和 AMP 的方法,具有准确、快速、简便的优点,能满足血浆中 MA 和 AMP 的实际监测要求。

[参考文献]

[1] 李桢,胡早秀,刘清. 甲基苯丙胺体内藏毒致急性中毒死亡法医学检验及其毒品危害[J]. 中国药物依赖性杂志,2005,14(6):453 - 455.

[2] 贺浪冲. 法医毒物分析[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社,2004:110 - 111.

[3] Namera A, Yashiki M, Liu JT, *et al*. Simple and simultaneous analysis of fenfluramine, amphetamine and methamphetamine in whole blood by gas chromatography - mass spectrometry after headspace solid phase microextraction and derivatization[J]. Forensic Sci Int, 2000, 109(3): 215 - 223.

[4] Wang SM, Giang YS, Ling YC. Simultaneous supercritical fluid extraction and chemical derivatization for the gas chromatographic isotope dilution mass spectrometric determination of amphetamine and methamphetamine in urine[J]. J Chromatogr B, 2001, 759(1):17 - 26.

[5] 徐鹏,邓艳萍,徐国柱. GC - MS 在苯丙胺类药物分析中的应用[J]. 中国药物滥用防治杂志,2003,9(5):42 - 46.

[6] Izumi K, Osamu N, Kunio O, *et al*. Determination of amphetamine and methamphetamine in human hair by head space solid phase microextraction and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection[J]. J Chromatogr B, 1998, 707(1): 99 - 104.

[7] Mc Avoy Y, Cole MD, Gueniat O. Analysis of amphetamines by supercritical fluid chromatography, high performance liquid chromatography, gas chromatography and capillary zone electrophoresis: a preliminary comparison[J]. Forensic Sci Int, 1999, 102(1): 13 - 22.

[8] Sato M, Hida M, Nagase H. Analysis of dimethylamphetamine and its metabolites in human urine by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry with direct sample injection[J]. Forensic Sci Int, 2002, 128(3):146 - 154.

[9] Santagati NA, Ferrara G, Marrazzo A. Simultaneous determination of amphetamine and one of its metabolites by HPLC with electrochemical detection[J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 30(2): 247 - 255.

[10] 杨小红,田开珍,王峰,等. 高效液相色谱 - 二极管阵列检测法同时测定临床中毒患者血浆中的甲基苯丙胺及苯丙胺[J]. 色谱,2003,21(5):497 - 499.

[11] 傅强,廖林川,陈礼莉,等. HPLC 法测定甲基苯丙胺与苯丙胺[J]. 四川大学学报(医学版),2007,38(6):1025 - 1028.

[12] 李小平,蒋经伟,范建中,等. 固相萃取 HPLC 法测定豆芽中 4 - 氯苯氧乙酸钠[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(3):267 - 269.

[13] 李小平,姚浔平,姚珊珊,等. 相萃取 HPLC 法测定水中 7 种除草剂[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(5):1040 - 1041,1237.

[14] 陈晓红,李小平,金米聪. 蔬菜中氨基甲酸酯类农药残留的 HPLC/MS 测定研究[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(9):1041 - 1043.

[15] 金米聪,陈晓红,李小平. 高效液相色谱荧光检测法同时测定全血中 5 种香豆素类杀鼠剂[J]. 色谱,2007,25(2):214 - 216.

[16] 金米聪,马建明,王立,等. 尿液中杀鼠萘的固相萃取高效液相色谱测定法[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2006,24(11):682 - 683.

[17] 常颖,郑珲,高利生. 超快速液相色谱法测定甲基苯丙胺[J]. 化学分析计量,2010,19(6):67 - 68.

(收稿日期:2011 - 04 - 07)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net