

动态液相微萃取-微波衍生化-气相色谱/选择离子检测-质谱法测定毛发中的苯丙胺类毒品

朱 丹, 孟品佳, 何洪源

(中国人民公安大学刑事科学技术系, 北京 100038)

摘要 :建立了一种便捷的毛发中 4 种苯丙胺毒品的检测方法。采用动态液相微萃取法用氯仿提取毛发消解液中的苯丙胺类毒品,然后在微波加热的条件下用 *N*-甲基-双三氟乙酰胺(MBTFA)进行衍生化处理,将反应液直接用气相色谱/选择离子检测-质谱法(GC/SIM-MS)检测。以 2-甲基苯乙胺为内标,在空白毛发中添加标准品做标准曲线得到 4 种苯丙胺类毒品的线性相关系数均不小于 0.996。衍生化后 4 种毒品在毛发中的最小检测限($S/N=3$)均为 50 pg/mg。4 种苯丙胺类毒品在毛发中的添加浓度为 5 ng/mg 时,5 次测定的相对标准偏差(RSD)分别为苯丙胺 6.0%,甲基苯丙胺 13.9%, β -A-(亚甲二氧基)苯丙胺 10.2%, β -A(亚甲二氧基)-甲基苯丙胺 9.2%。应用所建立的方法对苯丙胺类毒品吸食者的毛发进行检测,检出了这 4 种毒品,毛发样品的最小用量为 4.6 mg (约 20 cm 长)。该方法灵敏、简便、快速,可用于毛发中低含量苯丙胺类毒品的分析。

关键词 :动态液相微萃取 ;衍生化反应 ;气相色谱/选择离子检测-质谱法 ;苯丙胺类毒品 ;毛发

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2007)01-0016-05 栏目类别 :研究论文

Determination of Amphetamines in Human Hair Using Dynamic Liquid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Selected Ion Monitoring-Mass Spectrometry After Microwave Derivatization

ZHU Dan, MENG Pinjia, HE Hongyuan

(Department of Forensic Science, Chinese People's Public Security University, Beijing 100038, China)

Abstract : Human hair is an important specimen for drug abuse analysis owing to its easy collection, long surveillance time window and good correlation between the " degree of addiction " and actual drug concentration. A simple method for determination of 4 amphetamines in human hair was developed. The hair was digested under basic condition, and the drugs in it were extracted using microvolume of chloroform. The organic layer was then transferred into another tube to be derivatized with *N*-methyl-bis(trifluoroacetamide) (MBTFA) by microwave heating. Finally the reacted solution was detected by gas chromatography/selected ion monitoring-mass spectrometry (GC/SIM-MS) directly. 2-Methyl-phenyl ethylamine was used as an internal standard. Good linearities were obtained for 4 amphetamines with correlation coefficients better than 0.996. The limits of detection, based on a signal-to-noise ratio (S/N) of 3:1, were all about 50 pg/mg for amphetamine (AM), methamphetamine (MAM), methylenedioxy-amphetamine (MDA), and methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) in hair. The reproducibility of the method was satisfactory, with the relative standard deviations of 6.0% for AM, 13.9% for MAM, 10.2% for MDA and 9.2% for MDMA. Some real hair from the drug abusers was analyzed with this method. The minimal hair is less than 5 mg (about 20 cm). The method is highly sensitive, easy to operate, time-saving and economic, which can be used for trace analysis of amphetamines in human hair.

Key words : dynamic liquid-phase microextraction ; derivatization ; gas chromatography/selected ion monitoring-mass spectrometry (GC/SIM-MS) ; amphetamine drugs ; hair

收稿日期 2006-04-16

第一作者 朱 丹,女,硕士研究生,E-mail nadine401@163.com.

通讯联系人 孟品佳,女,博士,Tel (010)83903133,E-mail mngpinjia@163.com.

基金项目 2004 年公安部 C 类科研课题(No. 20049123401),北京教育委员会共建项目建设计划(No. SYS1004100436).

苯丙胺类毒品是一类具有强烈兴奋作用、食欲抑制作用以及温和致幻作用的物质,属于违禁毒品,滥用苯丙胺类毒品易引发许多社会问题。检验一个人是否吸食苯丙胺类毒品,通常是通过毛发^[1]和体液^[2,3]来检验。过去研究较多的是血^[4,5]、尿^[6]等生物检材,但是血和尿检材只能反映收集样品前的 1~3 天中的毒品服用情况,而毛发则具有易获取、稳定、易保存及不易作假等优点,而且它可提供吸毒者的毒品使用史及使用程度的信息,因此毛发检材的使用越来越受到法庭科学工作者的重视。与尿液或血液相比(含量通常为 $\mu\text{g/mL}$ 级),毛发中毒品及其代谢物的含量一般很低(ng/mg 级),而且毛发中的生物杂质含量很高,因此采用气相色谱(GC)分析时常常需要采用特殊的方法,如在使用气相色谱/质谱法(GC/MS)时,可采用电子捕获负离子化学源(NICI)。Martins 等^[7]用此方法检测苯丙胺类毒品,最小检测限为 4.3~91.8 pg/mg 。另一常用的提高灵敏度的方法就是对样品进行衍生化处理,它对于改善色谱行为、提高检测灵敏度、获得特征离子峰、增强检测的灵敏度同样具有明显的作用。

目前检测毛发中苯丙胺类毒品的常用方法是首先把毛发消解,然后经过固相萃取^[7,8]、液相萃取^[9]、超临界流体萃取^[10]等萃取技术对消解液进行萃取,用氮气将萃取液吹干后,在水浴加热条件下进行衍生化处理^[11];然后采用 GC/GC/MS 等^[7]作为检测手段进行检测。但是文献中采用的大体积萃取,再经过氮气吹干的过程,使得衍生化过程复杂、费时且成本较高。为了克服这些缺点,近年来也有人采用柱上衍生化的方法,如 Nishida 等^[11]在使用 Extrelut 柱萃取的同时进行柱上衍生化。

本文建立了一种更为简便、经济和灵敏的毛发中微量苯丙胺类毒品的提取与衍生化方法。毛发经过碱性条件消解后,直接加入小体积的($50 \mu\text{L}$)氯仿进行涡旋液相微萃取,不经过氮气吹干过程,直接吸取下层氯仿溶液($20 \mu\text{L}$)在微波加热的条件下进行衍生化反应,然后在选择离子检测(SIM)模式下直接进行 GC/MS 检测。该方法把毛发消解-液相微萃取-微波衍生化-GC/SIM-MS 检测等过程环环相扣地结合在一起,不仅简化了操作过程,减少了损失,而且方法的灵敏度高、重复性好、成本低,因此适于毛发中微量苯丙胺类毒品的检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 5050A 气相色谱-质谱联用仪,色谱柱为键合 DB-1 柱($30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm} \times 1 \mu\text{m}$),进样器温度

$250 \text{ }^\circ\text{C}$,柱箱起始温度 $100 \text{ }^\circ\text{C}$,保持 2 min,然后以 $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $220 \text{ }^\circ\text{C}$,保持 2 min;氦气作载气,流速 $2.0 \text{ mL}/\text{min}$,不分流。质谱检测器温度 $280 \text{ }^\circ\text{C}$,电子轰击离子源(EI),电离能 70 eV,选择的检测离子为 m/z 118, m/z 91, m/z 135 和 m/z 162,绝对电压 1.5 kV。

苯丙胺盐酸盐(AM)、甲基苯丙胺硫酸盐(MAM)、3,4-(亚甲二氧基)苯丙胺盐酸盐(MDA)购于国家麻醉品实验室,3,4-(亚甲二氧基)-甲基苯丙胺盐酸盐(MDMA)购于公安部物证鉴定中心;正二十一烷、2-甲基苯乙胺购于 Acros Organics 公司;N-甲基-双三氟乙酰胺(MBTFA)、N,O-双(三甲基硅)三氟乙酰胺(BSTFA)购于德国 Macherey-Nagel 公司;实验中所用试剂均为分析纯。

标准溶液的配制:精密称取 AM 2.7 g、MAM 1.2 g、MDA 1.2 g、MDMA 2.2 g,用甲醇溶液配制成 1 g/L 的标准溶液(以游离碱计)。

内标溶液的配制:精密称取 2-甲基苯乙胺 1 mg,用甲醇溶液配制成 $10 \text{ mg}/\text{L}$ 的 2-甲基苯乙胺溶液。称取正二十一烷 25 mg 用氯仿稀释到 25 mL 的容量瓶中,配制成 $1 \text{ g}/\text{L}$ 的正二十一烷溶液。

1.2 实验方法

取头发样品,用二氯甲烷超声振荡洗涤 2 次,晾干后剪成长约 1 mm 的碎段。取约 20 mg,精密称定质量,加入 4 种苯丙胺毒品及浓度为 $2 \text{ mg}/\text{L}$ 的 2-甲基苯乙胺溶液 $10 \mu\text{L}$,加入 $1 \text{ mol}/\text{L}$ 的 NaOH 溶液 1 mL,于 $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中加热 30 min,取出,加入少许 KCl(必须使溶液达到过饱和),然后加入氯仿溶液 $50 \mu\text{L}$,涡旋提取 1 min 后,离心 1 min,用 $50 \mu\text{L}$ 的注射器吸取下层液 $20 \mu\text{L}$ 放入另一小瓶中,加入 $10 \mu\text{L}$ 的 MBTFA,用封口胶封口后,在 300 W 下加热 2 min,然后直接进样,用 GC/SIM-MS 检测。

2 结果与讨论

2.1 内标的选择

本文采用了两种内标,在萃取条件和衍生化条件的考查中采用正二十一烷为内标,将其以一定浓度溶于萃取溶剂中或衍生化溶剂中直接使用,通过比较待测物(或衍生化后的待测物)与内标的峰面积比进行条件考查(其不被衍生化)。而在实际毛发的测试中,为了消除萃取过程及检测过程引入的误差,选择与苯丙胺类毒品性质相近的 2-甲基苯乙胺为内标,在毛发消解前加入,用内标法进行定量测定。

2.2 萃取条件的选择

2.2.1 萃取溶剂的选择

头发消解后,分别加入含有正二十一烷内标(1

mg/L)的氯仿、甲苯、乙酸乙酯溶液 50 μL ,涡旋提取 1 min,离心 1 min,取有机相进样,用 GC/SIM-MS 检测。以每种毒品的峰面积和正二十一烷的峰面积之比为参数,比较提取率。实验结果表明,氯仿作为萃取液时,不仅萃取率较高,而且可以作为衍生化反应的溶液,同时由于其密度比水大,有机相在下层,易于抽取,在经过萃取后,可以直接抽取下层有机溶液不经过氮气挥干,直接进行衍生化反应。所以选择氯仿为萃取溶液。

2.2.2 萃取溶剂用量的考查

添加 4 种毒品的头发消解液加入少许 KCl 后(使溶液达到过饱和),分别加入含有内标正二十一烷(1 mg/L)的氯仿溶液 20,40,50,100 和 200 μL ,涡旋、离心,取下层液进样,GC/SIM-MS 方法检测,以每种毒品的峰面积和内标峰面积之比考查相对提取率。实验数据表明加入氯仿溶剂的量越少,有机相中待测物浓度越大,检测的灵敏度越高。但有机相体积过小,不易抽取液体,故选择萃取溶剂用量为 50 μL 。

2.3 微波加热衍生化条件的考查

以甲基苯丙胺为例考查衍生化条件。

2.3.1 衍生化试剂的选择

考查了 BSTFA 和 MBTFA 两种衍生化试剂。在 300 W 功率下加热 3 min,分别对甲基苯丙胺进行硅烷化和酰化,结果在 BSTFA 作衍生化试剂时,只有极小部分的甲基苯丙胺被衍生化,而在 MBTFA 作衍生化试剂时,衍生化反应进行完全。可见 MBTFA 对氨基基团具有更强的衍生化能力。

2.3.2 微波功率的选择

取 100 mg/L 甲基苯丙胺的甲醇溶液 3 份各 20 μL ,置于小瓶内,用氮气吹干后,加入 2 μL 衍生化试剂、20 μL 含正二十一烷内标的氯仿溶液,用封口胶封口后置于微波炉内,分别在 100,300,500,800,1000 W 进行衍生化。以衍生化产物峰面积与内标峰面积的比值对微波功率作图,见图 1。

由图 1 可以看出,当功率达到 300 W 时,衍生化产物的含量趋于稳定。且实验中发现,如果采用的功率过大,检材损耗较大,所以采用过高的功率并不适宜,以 300~500 W 为佳。

2.3.3 微波加热时间的选择

取 100 mg/L 甲基苯丙胺的甲醇溶液 4 份各 20 μL ,置于小瓶内,用氮气吹干后,加入 2 μL 衍生化试剂、20 μL 含正二十一烷内标的氯仿溶液,用封口胶封口后置于微波炉内,在 300 W 的功率下,分别加热 1,1.5,2,3 min。以衍生化产物峰面积与内标峰面积的比值对加热时间作图,见图 2。

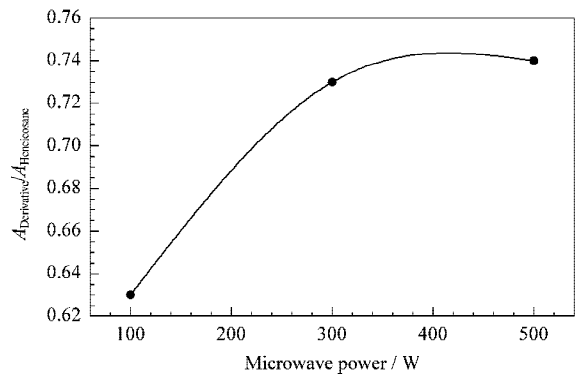


图 1 微波功率对甲基苯丙胺衍生化反应的影响

Fig. 1 Effect of microwave power on derivatization of MAM

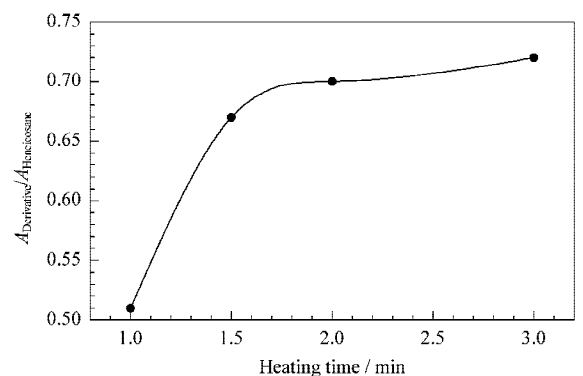


图 2 微波加热时间对甲基苯丙胺衍生化反应的影响

Fig. 2 Effect of microwave heating time on derivatization of MAM

由图 2 可以看出,当加热 2 min 后,衍生化产物的含量趋于稳定。且通过实验可知,加热时间不宜超过 3 min,时间过长,产物易挥发。所以加热时间以 2~3 min 为佳。

2.4 检测离子的选择

在上述优化的微波衍生化的条件下,对 4 种苯丙胺类毒品及毛发分析内标 2-甲基苯乙胺进行衍生化反应,获得标准品的衍生物质谱图。根据质谱图,发现 AM 和 MAM 衍生化后都具有 m/z 118 和 m/z 91 离子,MDA 和 MDMA 衍生化后都具有 m/z 135 和 m/z 162 离子,2-甲基苯乙胺衍生化后具有 m/z 118 离子。所以选择 m/z 118 和 m/z 91 作为 AM 和 MAM 的定性离子,选择 m/z 135 和 m/z 162 作为 MDA 和 MDMA 定性离子。并选择 m/z 118 作为 AM、2-甲基苯乙胺和 MAM 衍生化后的定量离子, m/z 162 作为 MDMA 衍生化后的定量离子, m/z 135 为 MDA 的定量离子。在 GC/SIM-MS 条件下,得出各种苯丙胺标准品的 MBTFA 衍生物的保留时间为:AM-TFA 8.39 min,2-甲基苯乙胺-TFA 9.75 min,MAM-TFA 10.00 min,MDA-TFA 12.85 min,MDMA-TFA 14.58 min(见图 3)。

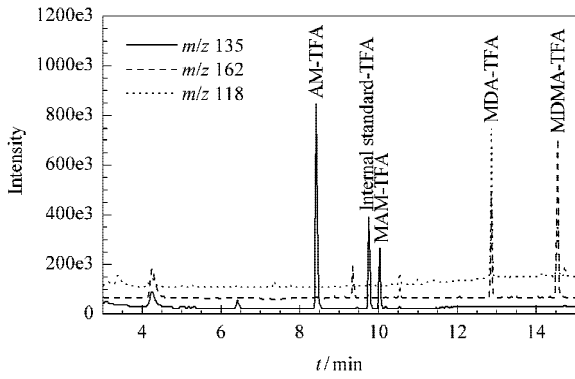


图 3 添加苯丙胺类毒品的毛发衍生化后的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of GC/SIM-MS of a hair sample spiked with amphetamines after MBTFA derivatization

2.5 空白毛发中添加毒品标准品的工作曲线

在空白毛发中分别添加 1, 10, 20, 50, 100 和 200 ng 的 4 种苯丙胺类毒品, 分别加入 20 ng 的 2-甲基苯乙胺(2 mg/L, 10 μ L), 经过消解、涡旋萃取、离心后, 用 50 μ L 的注射器吸取下层有机溶液 20 μ L, 加入 10 μ L 的 MBTFA, 在 300 W 下加热 2 min, 然后在上述 GC/SIM-MS 条件下分别进样 1 μ L。以上每组实验各重复 5 次, 取平均值, 以毛发中毒品的含量(x ng/mg)为横坐标, 以苯丙胺类毒品的峰面积和内标 2-甲基苯乙胺的峰面积的 5 次比值的平均值为纵坐标获得苯丙胺类毒品的线性方程。从表 1 中可以看出所得标准曲线线性关系良好。

表 1 空白毛发添加毒品的线性方程及最小检测限

Table 1 Regression equations and detection limits for hair spiked with amphetamines

Drug	Regression equation*	Correlation coefficient (r^2)	Linear range/(ng/mg)	Detection limit/(ng/mg)
AM	$y = 0.254x - 0.0468$	0.9970	0.05 - 10	0.05
MAM	$y = 0.0572x - 0.0052$	0.9983	0.05 - 10	0.05
MDA	$y = 0.1503x - 0.0105$	0.9983	0.05 - 10	0.05
MDMA	$y = 0.13x - 0.0049$	0.9963	0.05 - 10	0.05

* y : Peak-area ratio of amphetamine to internal standard; x : content of amphetamine in hair, ng/mg.

2.6 毛发中毒品的最小检测限

在上述优化的条件下, 在空白毛发中添加 4 种苯丙胺类毒品的混合液, 使得毛发中的 4 种毒品的含量均为 10 ng/mg, 5 ng/mg, 2.5 ng/mg, 500 pg/mg 和 50 pg/mg, 分别不经衍生化和衍生化后进样。不经衍生化时, 毛发中 AM 的最小检测限($S/N = 3$)为 1 ng/mg, MAM, MDMA, MDA 为 500 pg/mg。经过衍生化后毛发中这几种毒品 AM, MAM, MDA, MDMA 的最小检测限($S/N = 3$)均为 50 pg/mg。灵敏度提高了 10 倍以上。

2.7 回收率及精密度

在空白毛发中分别加入标准品混合溶液 50,

10 5 μ L (其中 4 种苯丙胺类毒品的质量浓度都为 2 mg/L), 加入 2 mg/L 的内标溶液 10 μ L, 消解、涡旋萃取、离心, 衍生化后进样, GC/SIM-MS 检测, 平行试验 5 次。计算每种毒品的峰面积和内标 2-甲基苯乙胺的峰面积之比, 求 5 次的平均值 R_1 及其相对标准偏差(RSD, 见表 2)。另取 1 mol/L 的 NaOH 溶液 1 mL, 同上添加标准品和内标、涡旋萃取、离心, 衍生化后进样, GC/SIM-MS 检测, 平行试验 5 次。计算每种毒品的峰面积和内标 2-甲基苯乙胺的峰面积之比, 求 5 次的平均值 R_2 。用 R_1 除以 R_2 得到相对回收率, 回收率结果见表 2。

表 2 毛发中添加不同含量的苯丙胺类毒品的回收率及精密度($n = 5$)

Table 2 Recoveries and reproducibility of amphetamines in different concentrations ($n = 5$)

Drug	Added/(ng/mg)	Recovery/%	RSD/%
AM	5	110.2	6.0
	1	115.8	7.7
	0.5	133.7	8.8
MAM	5	106.2	13.9
	1	103.4	14.1
	0.5	122.1	14.3
MDA	5	111.9	10.2
	1	111.4	5.6
	0.5	118.9	12.3
MDMA	5	117.8	9.2
	1	115.3	7.9
	0.5	101.8	13.1

2.8 吸毒者毛发的测定结果

应用所建立的方法对 10 余名苯丙胺毒品吸食者的毛发进行了检验, 多例检验出了甲基苯丙胺及其代谢物苯丙胺, 一例中检出上述 4 种苯丙胺毒品。其中吸毒者的毛发量从 4.6 mg 到 22.2 mg 不等, 从检验结果来看, 如果吸毒者成瘾性较重, 则一般采集大约 20 cm 的头发即可检出, 当毛发中毒品含量较低时则需要采集多一些的毛发来检验。图 4 为我

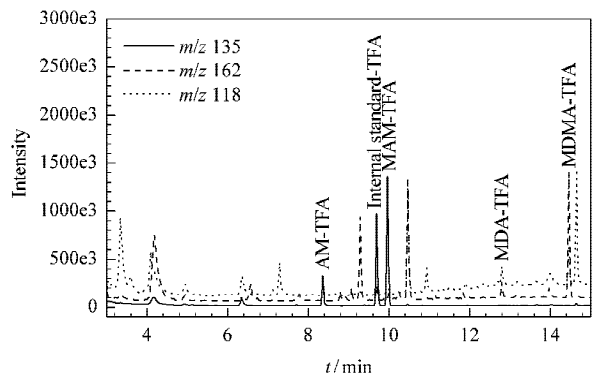


图 4 吸毒者毛发的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of GC/SIM-MS of the hair of an abuser

们用 4.6 mg 毛发通过上述方法检验的结果,其中含有 4 种苯丙胺成分。通过与添加标准品的毛发的定量数据相比较,计算得该毛发中 AM, MAM, MDA, MDMA 的含量分别为 1.52, 21.98, 0.33, 1.49 ng/mg。图 5 为相同条件下处理的空白对照毛发的色谱图。

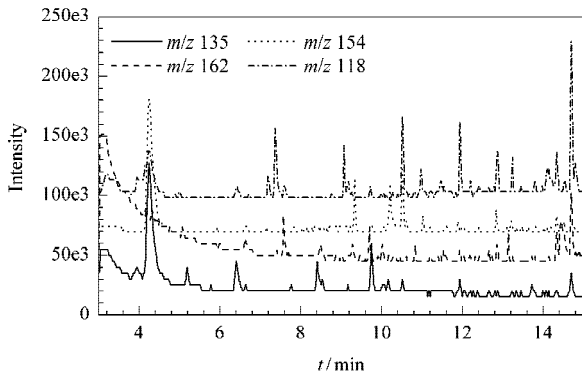


图 5 空白毛发的色谱图

Fig. 5 Chromatograms of GC/SIM-MS of blank hair

3 结论

本文采用了碱性条件消解毛发,动态液相微萃取方法提取毛发中的待测物,萃取后直接吸取下层氯仿溶液,在微波条件下进行衍生化反应,然后采用

GC/SIM-MS 方法检测,显著地提高了检验毛发中苯丙胺类毒品的灵敏度。该法灵敏、快速、简便,可用于毛发中微量苯丙胺类毒品的检测。

参考文献:

- [1] Gentili S, Torresi A, Marsili R, Chiarotti M, Macchia T. J Chromatogr B, 2002, 780: 183
- [2] El-Haj B M, Al-Amri A M, Hassan M H, Ali H S, Bin Khadem R K. Forensic Sci Int, 2003, 135: 16
- [3] Boatto G, Faedda M V, Pau A, Asproni B, Menconi S, Gerri R. J Pharm Biomed Anal, 2002, 29: 1073
- [4] Schutz H, Gotta J C, Erdmann F, Risse M, Weiler G. Forensic Sci Int, 2002, 126(3): 191
- [5] Yang X H, Tian K Z, Wang F, Li H D. Chinese Journal of Chromatography (杨小红, 田开珍, 王峰, 李焕德. 色谱), 2003, 21(5): 497
- [6] Zhang S Y, Huang Z P. Chinese Journal of Forensic Medicine (张绍雨, 黄增萍. 中国法医学杂志), 2005, 20(2): 86
- [7] Martins L, Yegles M, Chung H, Wennig R. J Chromatogr B, 2005, 825: 57
- [8] Berankova K, Habrdova V, Balikova M, Strejc P. Forensic Sci Int, 2005, 153: 93
- [9] Chen H, Zhang Z J, Nan N, Zhu J H. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (陈华, 张尊建, 南楠, 朱霁虹. 药物分析杂志), 2004, 24(2): 174
- [10] Allen D L, Oliver J S. Forensic Sci Int, 2000, 107: 191
- [11] Nishida M, Namera A, Yashiki M, Kojima T. J Chromatogr B, 2003, 789: 65

会 讯

感知科学品质 把握生命精彩

——记第 56 届中国实验室技术及装备展和生命科学仪器与应用学术报告会

金秋来临之际,由中华人民共和国科学技术部批准、中国分析测试协会与国药励展展览有限责任公司共同主办的 2006 '生命科学仪器与应用学术报告会暨展览会(ScienTech Expo)携第 56 届中国实验室技术及装备交易会(Expolab)于 2006 年 10 月 24 日~27 日在天津国际展览中心隆重举行。

本届展会强调专业性的展会与高水平的学术会议共促进、同发展的办会理念,在学术会议方面,主办方精心安排了“主题报告”和“专题报告”5 场共计 3 天的学术会议。会议吸引了来自全国各地实验室、医院及高校的科研人员、教师及学生。规模空前盛大,仅 24 日一天的主题报告会,就有 800 多位专业观众参加。

会议邀请到 J. K. Nicholson 教授(伦敦帝国工程学院)、Edward S. Yeung 教授(Iowa State University)及刘德培院士、杨胜利院士等著名专家作精彩的大会主题报告。他们向与会同行介绍了最新行业动态及发展,并共同探讨了我国生命科学的发展状况与趋势。这些报告将对我国生命科学的发展产生新的启迪。

(国药励展化试展览部 供稿)