

LC-MS/MS 测定尿液中可卡因及其代谢物苯甲酰爱康宁

孙其然^{1,2}, 向平², 严慧^{1,2}, 沈敏²

(1. 复旦大学上海医学院法医学系, 上海 200032; 2. 司法部司法鉴定科学技术研究所上海市法医学重点实验室, 上海 200063)

摘要: 目的 建立尿液中可卡因(cocaine, COC)及其代谢物苯甲酰爱康宁(benzoylecgonine, BZE)的液相色谱-串联质谱分析方法。方法 尿液经固相萃取后,用 Allure PFP 丙基柱分离,以 V(甲醇):V(20 mmol/L 乙酸胺和 0.1% 甲酸的缓冲溶液)=80:20 为流动相,采用二级质谱多反应监测模式检测 COC 和 BZE。按 10 mg/kg 的剂量对豚鼠腹腔注射可卡因,给药后收集 7d 尿液。结果 尿液中 COC 和 BZE 在 2.0~100 ng/mL 质量浓度范围内线性关系良好($r=0.9995$),最低检测限(LOD)为 0.5 ng/mL;回收率大于 90%;日内和日间精密密度均小于 6%;豚鼠尿液中主要检测目标物是 BZE,且 BZE 检测时限也较 COC 长。结论 所建方法灵敏度高,选择性好,适用于尿液中可卡因和苯甲酰爱康宁的检测。

关键词: 法医毒理学; 色谱法, 高压液相; 串联质谱法; 固相萃取; 尿液; 可卡因; 苯甲酰爱康宁

中图分类号: DF795.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-5619(2008)04-0268-05

Simultaneous Analyses of Cocaine and its Metabolite Benzoylecgonine in Urine by LC-MS/MS

SUN Qi-ran^{1,2}, XIANG Ping², YAN Hui^{1,2}, SHEN Min²

(1. Department of Forensic Science, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Forensic Medicine, Institute of Forensic Science, Ministry of Justice, P.R.China, Shanghai 200063, China)

Abstract: Objective To establish a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous analysis of cocaine (COC) and its metabolite benzoylecgonine(BZE) in urine samples. **Methods** A single dose of COC (10 mg/kg) was injected intraperitoneally into guinea pigs and urine samples were collected for 7 days. The urine samples were extracted by auto solid phase extraction (SPE), separated by the Allure PFP propyl column with a mobile phase consisting of methanol and 20 mmol/L ammonium acetate buffer [0.1% formic acid (80:20, V/V)], and then analyzed by LC-MS/MS. Multiple reaction monitoring (MRM) mode was used to analyze COC(m/z 304.2→182.3, m/z 304.2→150.1) and BZE (m/z 290.2→168.3, m/z 290.2→105.0). **Results** COC and BZE showed a fairly good linearity over the range of 2.0~100 ng/mL ($r=0.9995$). The detection limit was 0.5 ng/mL. The recovery rate was greater than 90% and the deviation of intra- and inter-day precision was less than 6%. BZE was the major target detected in urine samples, and its detection window was longer than COC. **Conclusion** This newly developed method shows high sensitivity and selectivity, and is suitable for the simultaneous analysis of cocaine and benzoylecgonine in urine samples.

Key words: forensic toxicology; chromatography, high pressure liquid; tandem mass spectrometry; solid phase extraction; urine; cocaine; benzoylecgonine

可卡因(cocaine, COC)是一种中枢神经兴奋剂,也是一种常见的滥用药物,它在体内的主要代谢物是苯甲酰爱康宁(benzoylecgonine, BZE)^[1]。目前国内虽然未见可卡因滥用的流行,但仍应适时建立可卡因及其代谢物在尿液中的分析方法,为今后可能遇到的相关司法案件的鉴定提供参考依据。

已报道的可卡因的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[2]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[3]和气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[4-7]等,其中尿液中可卡因及其代谢物的检测主要是用 GC-MS。而近年来发展较快的液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)与 GC-MS 相比,应用范围更广,它不受被分析物挥发性、极性、热稳定性的限制,也无需衍生化过程;多反应监测模式(MRM)能锁定目标物的母离子/子离子对,有效降低噪音干扰,因而在法医和临床毒物分析中应用前景广阔。本研究旨在建立更灵敏的尿液中可卡因及苯甲酰爱康宁的 LC-MS/MS 分析方法。

基金项目:科研院所社会公益研究专项资助项目(GY0601)

作者简介:孙其然(1984-),女,江苏常州人。硕士研究生,主要从事法医毒物学研究。Tel: 021-52352955。

通讯作者:沈敏。研究员,主要从事法医毒物学研究。Tel: 021-52361148, Email: minshensfd@hotmail.com。

1 材料和方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 对照溶液配制

COC、BZE 对照品 (1.0 mg/mL, 美国 Cerilliant 公司) 用甲醇稀释, 配制成 50 ng/mL 的混合对照溶液; 同位素内标 COC-d₃、BZE-d₃ 对照品 (1.0 mg/mL, 美国 Cerilliant 公司) 用甲醇稀释, 配制成 100 ng/mL 的混合内标溶液。取盐酸可卡因 (纯度>99%, 国家麻醉品实验室) 适量精密称定, 配制成 10 mg/mL 的水溶液。

1.1.2 试剂

甲醇 (HPLC 级) 和乙腈 (HPLC 级) 购自美国 Fisher Scientific 公司; 甲酸和乙酸胺 (HPLC 级) 购自瑞士 Fluka 公司; 二氯甲烷、三乙胺、异丙醇等 (分析纯) 购自上海国药集团; 去离子水由 Milli-Q 超纯水系统 (美国 MILLIPORE 公司) 制得。

缓冲液: 20 mmol/L 乙酸铵和 0.1% 甲酸缓冲液: 称取 0.77 g 乙酸铵溶于 450 mL 水中, 再加入 50% 的甲酸 0.92 g 后定容至 500 mL, pH 值约为 4。

1.2 仪器

ASPEC XL4 全自动固相萃取仪 (美国 Gilson 公司), C₁₈ 固相小柱 (美国 J.T.Bakerbond 公司), QL 型空气泵 (山东济南), API4000 串联三重四极杆质谱仪 (美国 Applied Biosystems 公司), Agilent 1100 高效液相色谱输液泵、自动进样器 (美国 Agilent 公司)。

1.3 空白尿样

人源空白尿样 (健康志愿者提供) 以及在动物实验中豚鼠空白尿样。

1.4 实验动物

普通级豚鼠 2 只, 体质量: 275 g, 295 g。

1.5 样品前处理

取 0.5 mL 尿样, 加入 40 μL 混合内标, 分别加入 1.0 mL 水和 1.0 mL 磷酸缓冲液 (pH=7) 进行稀释, 涡旋混合 1 min, 868×g 离心 1 min, 转移上清液 (约 2.5 mL) 至 3.0 mL 的固相萃取 (SPE) 上样管中。进行 SPE 萃取时, 首先用 2 mL 甲醇、2 mL 水和 2 mL 磷酸缓冲液 (pH=6.8) 依次活化固相小柱, 随后以 1 mL/min 的速度上样, 上样量设定为 2.5 mL。然后依次用 2 mL 水、1 mL 醋酸缓冲液 (pH=4) 和 0.2 mL 甲醇淋洗固相柱去除杂质。干燥小柱 20 min 后, 用 3 mL 新鲜配制的 V(二氯甲烷):V(异丙醇):V(三乙胺)=80:20:1 混合溶剂以 0.5 mL/min 的速度洗脱分析物。收集的洗脱液在 60℃ 水浴中空气流下吹干, 残留物用 200 μL 流动相定容, 进样 5 μL 供 LC-MS/MS 分析。

1.6 色谱条件

色谱柱为 Restek Allure PFP 丙基柱 (100 mm×

2.1 mm, 5 μm), 前接 Phenomenex 保护柱。流动相为 V(甲醇):V(20 mmol/L 乙酸胺和 0.1% 甲酸缓冲溶液)=80:20, 流速: 200 μL/min。

1.7 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源正离子模式 (ESI+); 扫描方式: 多反应监测模式 (MRM); 离子喷雾电压 (IS): 5500 V; 碰撞气氮气 (CAD): 7 psi (48.265 kPa); 帘气 (CUR): 25 psi (172.375 kPa); 离子源气 1 (GS1): 35 psi (241.325 kPa); 离子源气 2 (GS2): 35 psi (241.325 kPa); 离子源温度: 450℃。

2 结果与讨论

2.1 SPE 条件的选择

ASPEC XL4 全自动固相萃取仪一批可以同时处理 4 个样品, 一次可以设定 5 批共 20 个样品, 大大降低了实验人员的劳动量, 而且电脑控制的萃取过程可以确保每一批样品处理的均质性, 前处理过程中的随机误差有效地降低了, 回收率也更加稳定。

在萃取过程中, 清洗柱最后一步用甲醇, 一方面是为了带走柱上残留的水相, 以利于固相柱的干燥; 另一方面是为了洗去杂质, 但同时也会降低回收率。如果减少甲醇的用量则可以显著提高 COC 和 BZE 的回收率, 但干燥时间也需相应延长, 且杂质质量会增加。残留的水溶性杂质以及脂溶性的基质成分会使 COC 和 BZE 的色谱峰严重变形。实验结果表明, 将甲醇的用量从 1 mL 减少到 0.2 mL, 干燥时间相应从 15 min 增加至 20 min, 可使洗脱之前固相柱得到充分干燥, 从而得到相对较高的回收率和较少的杂质干扰。V(二氯甲烷):V(异丙醇):V(三乙胺)=80:20:1 混合溶剂能同时洗脱 COC 及其极性代谢物 BZE; 较慢的洗脱速度 (0.5 mL/min) 能让洗脱液和固定相充分接触, 从而增加目标物的洗出量。

2.2 定性与定量离子对的选择

分别将 COC、BZE、COC-d₃、COC-d₈ 的对照品 (1.0 mg/mL) 用流动相配制成 100 ng/mL 的溶液, 选用 ESI+ 离子化模式, 流动注射质谱分析, 通过全扫描方式得到各分析物的二级质谱图 (图 1)。把 [M+1]⁺ 准分子离子峰作为母离子, 丰度较强的两个离子作为子离子, 同时优化去簇电压 (DP) 和碰撞能量 (CE)。最终每个分析物选定两对母离子/子离子对, 其中第一对离子对用于定量分析。结果见表 1。COC 和 BZE 化学结构中共享的苯甲酸酯在一级裂解过程中碰撞断裂, 中性丢失苯甲酸 (m/z 122)。

2.3 选择性

取不同来源的空白尿样按 “1.5” 项下处理后进

样,结果如图 2(a);向空白尿样中添加 COC 和 BZE 对照品,使其质量浓度均为 2.0 ng/mL,按“1.5”项下处理后进样,结果如图 2(b);表明空白尿液中的内源性物质不会干扰 COC 和 BZE 的测定。

表 1 COC、BZE 和内标的 LC-MS/MS 参数

化合物	离子反应	保留时间 t_R /min	DP/V	CE/eV
COC	304.2→182.3 ^b	5.81	60	28
	304.2→150.1			35
BZE	290.2→168.3 ^b	2.04	70	26
	290.2→105.0			43
COC-d ₃ (内标)	307.1→185.3 ^b	5.88	60	27
	307.1→153.2			35
BZE-d ₃ (内标)	298.3→171.3 ^b	2.04	60	27
	298.3→110.2			46

注:1)表示定量母离子/子离子对

2.4 线性关系

在空白尿样中添加不同量的 COC 和 BZE 混合对照溶液,得到一系列质量浓度分别为 2.0、4.0、10、20、40、80 和 100 ng/mL 的尿液样品,按“1.5”项下处理后进样。以目标物 and 同位素内标峰面积之比对目标物的质量浓度作线性回归,结果表明尿液中 COC 和 BZE 在 2.0~100 ng/mL 质量浓度范围内具有良好的线性关系。线性回归方程分别为: $y=0.2690x+0.0465$, $r=0.9995$ (COC); $y=0.4418x+0.4573$, $r=0.9995$ (BZE)。在定量下限 (LOQ) 附近添加一系列低质量浓度的样品,以信噪比大于等于 3 ($S/N \geq 3$) 的最低质量浓度为

最低检测限 (LOD)。结果 COC 和 BZE 的 LOD 均为 0.5 ng/mL。这一结果比用 GC-MS 所能达到的 LOD (2 ng/mL)^[6] 更低,可见用 LC-MS/MS 检测尿液中 COC 和 BZE,能提高分析方法的灵敏度。

2.5 精密度和准确度

取空白尿样 0.5 mL, 添加不同量的 COC 和 BZE 混合对照溶液,分别配制成低、中、高 (2.0、20 和 80 ng/mL) 三个质量浓度,每个质量浓度点 6 个重复样品,按“1.5”项下方法处理后进样分析,计算得每个质量浓度样品的相对标准偏差 (RSD) 作为日内精密度的;每天配制高、中、低三种质量浓度,每个质量浓度点 6 个重复样品,按相同方法分析,连续 4 d,计算得每个质量浓度样品的 RSD 作为日间精密度。以质控样品的分析质量浓度平均值与添加质量浓度的百分比为准确度。结果见表 2。

本实验中采用了同位素内标 COC-d₃ 和 BZE-d₃, 它们和分析物相似的理化性质有效地降低了测定的随机误差,结果使包括 LOQ 在内的三个质量浓度点附近的日内和日间精密度均小于 6%, 而准确度在 (100±10)% 以内。

2.6 回收率考察

向空白尿样中添加 COC 和 BZE 混合对照溶液,配制成低、中、高三个质量浓度,每个质量浓度点 6 个重复样品, SPE 提取后进样,测得分析物的响应值为 C_i; 另取 18 个空白尿样用 SPE 提取后残留物中添加对应质量浓度的混合对照溶液 (每个质量浓度 6 个重

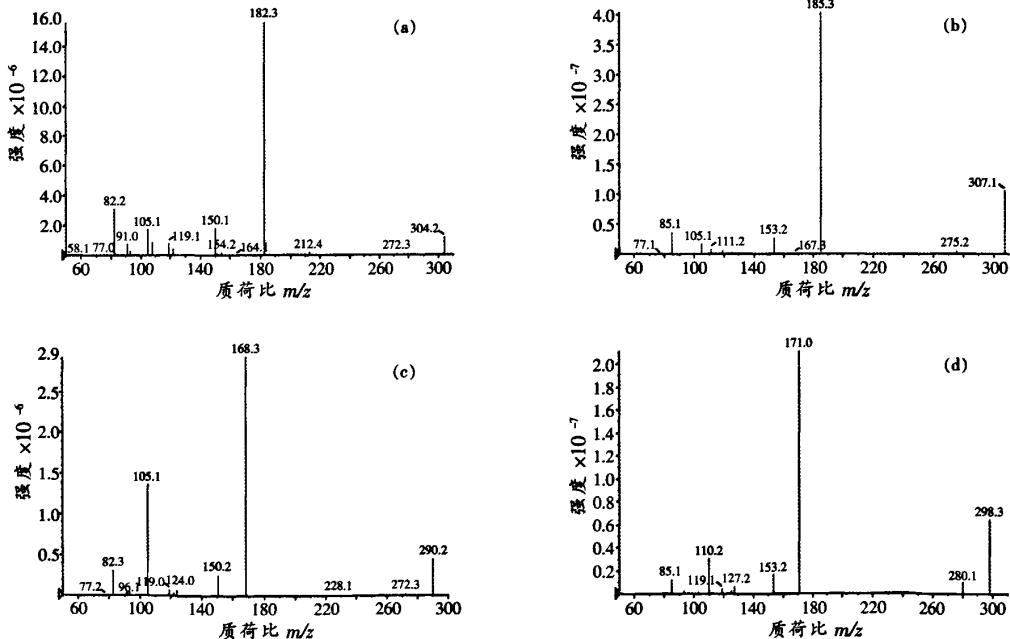


图 1 COC(a)、COC-d₃(b)、BZE(c)、BZE-d₃(d)的二级质谱图

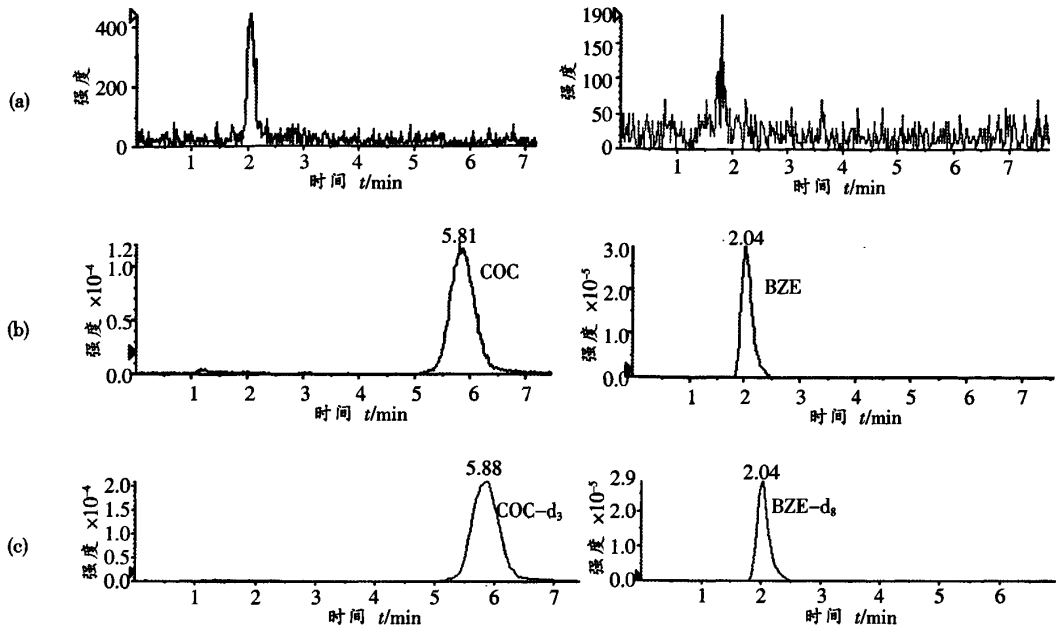


图2 MRM模式下的色谱图(a)空白尿样,(b)添加COC和BZE质量浓度均为2.0 ng/mL的尿样,(c)IS

复样),测得的分析物的响应值为 C_2 。回收率= $C_1/C_2 \times 100\%$,结果见表2。

2.7 基质效应考察

基质效应(matrix effect)是指在生物样品前处理过程中残留下来的基质对目标物在质谱中离子化的影响,可以表现为离子抑制作用或增强作用。取不同来源的空白尿样,按“1.5”项下方法提取后残留物中添加混合对照溶液,配成高、中、低三个质量浓度,每个质量浓度点6个重复样品,测得分析物的峰面积设为 A_1 ;另取相同量的混合对照溶液直接进样分析,测得分析物的峰面积设为 A_2 。基质效应= $A_1/A_2 \times 100\%$,结果见表2。从表2可见,COC的离子化基本不受影响;而BZE的离子化则受到抑制,在质量浓度较低时尤甚。这样的抑制作用原本会影响到尿液中BZE的真实质量浓度的测定,但由于使用BZE- d_8 作内标,两者相似的理化性质保证了它们从提取到色谱分离,再到质谱检测行为的一致性。用

BZE和BZE- d_8 的峰面积比值来定量,能抵消基质对BZE离子化的抑制作用,从而不影响BZE的定量结果。

2.8 稳定性考察

用空白尿液添加COC和BZE混合对照溶液,配制成低、中、高(2.0、20和80 ng/mL)三个质量浓度的样品各6份,在前处理结束后立即进样,将测得的响应值与24 h后再次进样的检测结果相比较,发现COC和BZE三个质量浓度的相对偏差分别为:6.1%,5.0%,4.1%(COC)和5.4%,3.6%,1.8%(BZE),表明提取后的样品在24 h内稳定。

3 应用

按10 mg/kg的剂量对2只豚鼠腹腔注射可卡因,然后置于豚鼠代谢笼中饲养,收集7 d尿液。收集的尿液按“1.5”项下处理进样,测得尿液中COC和BZE质量浓度,结果见表3。

表2 尿样中COC和BZE的测定结果

(n=6,%)

化合物	质量浓度 $\rho/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内精密度 RSD	日间精密度 RSD	回收率	准确度	基质效应
COC	2.0	5.9	5.6	93.7	99.2	89.3
	20	4.4	3.9	91.1	102.5	97.8
	80	4.2	4.7	96.5	101.5	102.8
BZE	2.0	5.0	4.8	97.9	90.7	28.6
	20	3.8	4.0	91.7	106.5	39.2
	80	2.1	2.3	95.9	101.4	62.1

表3 豚鼠腹腔注射可卡因后7d内尿液中

时间 t/d	COC 和 BZE 的质量浓度 (ρ/ng·mL ⁻¹)			
	1号豚鼠		2号豚鼠	
	COC	BZE	COC	BZE
1	3.1	89.2	2.3	91.2
2	-	+	+	5.1
3	-	-	-	4.8
4	-	-	-	2.7
5	-	-	-	+
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-

注：“-”表示未检出；“+”表示检出，但质量浓度<LOQ

据文献报导人体注射 120 mg 可卡因后，24 h 尿中排出的原体为给药量的 1%~9%，代谢物苯甲酰爱康宁占 26%~49%^[1]，而从表 3 来看，给药后 1 d，豚鼠尿液中 BZE 的含量约是 COC 的 30~45 倍，同文献中的结果基本一致，证实了吸食 COC 后经体内代谢，尿液中主要检测目标物应为 BZE。

BZE 不仅在尿液中的含量较 COC 高，而且检测时限较 COC 长。由此可见，进行尿液中可卡因筛查时，同时检测可卡因的代谢物苯甲酰爱康宁是非常必要的。

4 结 论

本研究采用 SPE 前处理，建立了尿液中 COC 和 BZE 的 LC-MS/MS 检测方法，最低检测限可低至 0.5 ng/mL。将所建方法应用于豚鼠的尿液检测，发现

COC 经体内代谢后，尿液中主要检测目标物是 BZE，且 BZE 检测时限较 COC 长。

参考文献：

- [1] 沈敏. 体内滥用药物分析[M]. 北京: 法律出版社, 2003.
- [2] 孙林, 宋君, 何威, 等. 高效液相色谱法测定小鼠血清中可卡因的含量[J]. 中国法医学杂志, 2002, 17(3): 165-166.
- [3] 蒋和平. 尿液中可卡因及其代谢物的检测研究[J]. 四川大学学报自然科学版, 2005, 42(4): 794-797.
- [4] de Jager LS, Andrews AR. Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in urine using solvent microextraction in conjunction with gas chromatography[J]. J Chromatogr A, 2001, 911(1): 97-105.
- [5] Yonamine M, Silva OA. Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography-mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoylecgonine [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 773(1): 83-87.
- [6] Cardona PS, Chaturvedi AK, Soper JW, et al. Simultaneous analyses of cocaine, cocaethylene, and their possible metabolic and pyrolytic products [J]. Forensic Sci Int, 2006, 157(1): 46-56.
- [7] Saito T, Mase H, Takeichi S, et al. Rapid simultaneous determination of ephedrine, amphetamines, cocaine, cocaine metabolites, and opiates in human urine by GC-MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(1): 358-363.

(收稿日期: 2008-02-02)

(本文编辑: 刘伟)

本刊对有关撰稿问题的声明

为了维护本刊的声誉和读者的利益，现对来稿中出现的有关撰稿问题声明如下。

1 对“一稿两投”的处理

对出现下列几种情况之一者本刊视为“一稿两投”：(1)同时投寄本刊和另一中文刊物；(2)已被另一中文刊物刊出又投寄本刊；(3)已被另一中文刊物刊出，仍对本刊寄出的终校稿件签字，同意刊出；(4)同时或先后被本刊和另一中文刊物刊出。对“一稿两投”的作者，本刊在 2 年内拒绝发表其作为第一作者的文稿，并在本刊刊出“一稿两投”作者的姓名和单位以及撤销该论文的通告，并向其所在单位及相关期刊进行通报。

2 对“化整为零”文稿的处理

对从一项完整的科学研究内容中选取一个或几个不同指标，分割成若干结构相同或相似的文稿，分次分刊投送，致使单篇文稿内容单薄者，如被本刊录用，将摘登其部分内容。

3 对“抄袭剽窃”行为的处理

对基本资料均抄袭国内或国外已发表的论文以及文章的作者署名未征得署名者本人同意等抄袭剽窃行为，一经查实，本刊在 5 年内不予发表该作者作为第一作者所撰写的一切文稿。

LC-MS/MS测定尿液中可卡因及其代谢物苯甲酰爱康宁

作者: [孙其然](#), [向平](#), [严慧](#), [沈敏](#), [SUN Qi-ran](#), [XIANG Pin](#), [YAN Hui](#), [SHEN Min](#)
作者单位: [孙其然, 严慧, SUN Qi-ran, YAN Hui \(复旦大学上海医学院法医系, 上海, 200032; 司法部司法鉴定科学技术研究所上海市法医学重点实验室, 上海, 200063\)](#), [向平, 沈敏, XIANG Pin, SHEN Min \(司法部司法鉴定科学技术研究所上海市法医学重点实验室, 上海, 200063\)](#)
刊名: [法医学杂志](#) **ISTIC**
英文刊名: [JOURNAL OF FORENSIC MEDICINE](#)
年, 卷(期): 2008, 24(4)
被引用次数: 4次

参考文献(7条)

1. [沈敏](#) [体内滥用药物分析](#) 2003
2. [孙林](#). [宋君](#). [何威](#) [高效液相色谱法测定小鼠血清中可卡因的含量](#)[期刊论文]-[中国法医学杂志](#) 2002(03)
3. [蒋和平](#) [尿液中可卡因及其代谢物的检测研究](#)[期刊论文]-[四川大学学报\(自然科学版\)](#) 2005(04)
4. [de Jager LS](#). [Andrews AR](#) [Development of a screening method for cocaine and COcaine metabolites in urine using solvent microextraction in conjunction with gas chromatography](#) 2001(01)
5. [Yonamine M](#). [Silva OA](#) [Confirmation of cocaine expoasure by gas chromatography-mags spectrometry of urine extracts after metbylation of benzoylcegonine](#) 2002(01)
6. [Cardona PS](#). [Chaturvedi AK](#). [Soper JW](#) [Simultaneous analyses of cocaine, cocaethylene, and their possible metabolic and pyrolytic products](#) 2006(01)
7. [Saito T](#). [Mase H](#). [Takeichi S](#) [Rapid simultaneous determination of ephedrines, amphetamines, cocaine, cocaine metabolites. and opiates in human urine by GCMS](#) 2007(01)

引证文献(4条)

1. [向平](#). [沈敏](#). [卓先义](#) [液相色谱-质谱分析中的基质效应](#)[期刊论文]-[分析测试学报](#) 2009(6)
2. [王小波](#). [叶能胜](#). [王继芬](#). [谷学新](#) [液液萃取-气相色谱法测定尿液中的可卡因](#)[期刊论文]-[现代仪器](#) 2010(1)
3. [王小波](#). [叶能胜](#). [王继芬](#). [谷学新](#) [可卡因及代谢物的分析检测研究进展](#)[期刊论文]-[化学通报\(印刷版\)](#) 2010(2)
4. [王小波](#). [叶能胜](#). [谷学新](#). [王继芬](#) [气相色谱法测定尿液中可卡因及其代谢物爱冈宁甲基酯](#)[期刊论文]-[分析化学](#) 2009(z1)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_fyzz200804009.aspx

授权使用: 浙江大学(wfzjdx), 授权号: 86f25f60-0757-4d92-afe8-9db20185e708

下载时间: 2010年7月13日