

柱切换 LC-MS/MS 分析吸毒尿样中的吗啡、 *O*⁶-单乙酰吗啡、可待因、乙酰可待因

梁 晨, 叶海英, 张玉荣, 汪 蓉, 陈永生

(上海市公安局刑事科学技术研究管理中心, 上海市现场物证重点实验室, 上海 200083)

摘要: 建立在线固相萃取即柱切换 LC-MS/MS 方法, 分析吸毒者尿样中的吗啡、*O*⁶-单乙酰吗啡、可待因、乙酰可待因。以吗啡 d₃ 为内标, 预处理柱为 Oasis HLB 2.1 mm × 20 mm × 25 μm, 分析柱为 Xterra MS C₁₈ 2.1 mm × 150 mm × 3.5 μm, 用水作预处理流动相, 分析流动相用含甲酸铵和甲酸的水、乙腈梯度洗脱, 质谱采用电喷雾离子源, 正离子 MRM 扫描。100 μL 尿样直接进样分析, 尿样中吗啡、*O*⁶-单乙酰吗啡、可待因、乙酰可待因的检测限为 0.3~1 μg/L, 线性关系良好, 相关系数 *r* 在 0.999 1 以上。

关键词: 液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS); 柱切换; 吗啡; *O*⁶-单乙酰吗啡; 可待因; 乙酰可待因; 吸毒尿样
中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2011)03-0159-05

Determination of Morphine, *O*⁶-Monoacetylmorphine, Codeine and Acetylcodeine in Heroin Addicts' Urine by On-Line Solid Phase Extraction (Column Switching) Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

LIANG Chen, YE Haiying, ZHANG Yurong, WANG Rong, CHEN Yongsheng

(Shanghai Key Laboratory of Crime Scene Evidence, Shanghai Institute of Forensic Science, Shanghai 200083, China)

Abstract: Morphine, *O*⁶-monoacetylmorphine, codeine and acetylcodeine in heroin addicts' urine samples were analyzed by on-line solid-phase extraction (column switching) liquid chromatography-tandem mass spectrum (LC-MS/MS). The urine samples were directly injected into a extraction column (Oasis HLB 2.1 mm × 20 mm × 25 μm). After a washing step with the extraction mobile phase, the retained compounds were flushed into the analytical column (Xterra MS C₁₈ 2.1 mm × 150 mm × 3.5 μm) with the analytical mobile phase and morphine-d₃ as internal standard. The positive electricspray ionization mode was applied, multiple reaction monitoring (MRM) mode was used to analyze target compounds. Identification was based on the compound's retention time and two pairs of precursor to-product ion transitions. The limit of detections (LODs) are 1 μg/L for morphine, codeine, *O*⁶-monoacetylmorphine and 0.3 μg/L for acetylcodeine. The method has excellent linearity, and the

收稿日期: 2010-08-18; 修回日期: 2010-10-28

作者简介: 梁 晨, 女, 硕士研究生, 主检法医师, 从事毒物、毒品分析工作。E-mail: morning_liangch@sohu.com

通信作者: 张玉荣, 男, 主任法医师, 从事毒品、毒物分析工作。E-mail: yr_zhang@126.com

linear correlation coefficient is greater than 0.999 1. The method shows high sensitivity and selectivity, which is suitable for analysis of morphine, O^6 -monoacetylmorphine, codeine and acetylcodeine in heroin addicts' urine samples.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrum (LC-MS/MS); column switching; morphine; O^6 -monoacetylmorphine; codeine; acetylcodeine; heroin addicts' urine

近年来,随着国际毒潮持续泛滥,境外毒品对我国的侵袭日益加剧,吸食或注射海洛因的人员也越来越多。为了打击毒犯、维护正义,禁毒部门逐年加大对毒品案件的侦查力度。禁毒部门在侦破毒品案件时,常与吸毒嫌疑人员打交道,由于“单抗免疫检测试剂盒”容易受到某些药物的干扰出现假阳性,不能直接单独用于吸毒案件的定性依据,因此定性检验这类人群体液中的毒品来判断他们是否吸食毒品海洛因就尤为重要。海洛因进入人体后,很快代谢为吗啡和单乙酰吗啡,几乎检测不到原体海洛因,而吗啡属于水溶性药物,极性较大,应用气相色谱直接分析较为困难,而且灵敏度低。目前,已有很多 GC/MS 法分析尿样中吗啡的报道,但检材必须采用混合溶剂(V (氯仿): V (异丙醇)=9:1 的溶剂)提取,丙酸酐衍生化后用 GC/MS 定性分析,样品处理繁琐,难以满足实际案件快速检验的需要^[1-3]。

样品前处理是生物样品分析的重要步骤,也是费时、工作量大的过程。柱切换技术通过阀切换将处理试样与分析统一在一个系统中,不仅增加了处理样品的安全性,而且减少了人为因素的影响,提高了方法的准确度和精密度^[4-5]。液相色谱-质谱(LC-MS/MS)联用技术集液相色谱高效的在线分离能力与质谱的高灵敏度、高选择性于一体,已成为法医毒物分析强有力的工具。多反应监测(MRM)模式通过两次离子选择作用,锁定目标物的母离子-子离子对,提高了分析的专一性和灵敏度^[6]。本工作通过仪器改装,将柱切换技术与 LC/MS 联用,尿样直接进样分析吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡、可待因和乙酰可待因。

要实现柱切换,仪器至少需配置双泵输液系统和高压流路选择阀。实验室在购买了整套的 Waters Alliance 2695/Quattro Premier XE 串联四极杆液-质联用仪后,为了实现在线前处理(即柱切换功能),又增配了 1 台 Waters 1525 高压二元泵和 1 个十通切换阀。通过内部流路的重新连接和改装,用 Alliance 2695 的进样器实现大体积进样,1525 高压二元泵输送预处理流动相,样品在预处理柱上被净化和富集,冲洗一定

时间(即预处理时间)后,通过十通切换阀,使分析流动相进入预处理柱,把被测组分冲入 Alliance 2695 的流路中,经过一定时间(即切换时间)后,十通切换阀又切换成原状,Alliance 2695 继续输送分析流动相进行色谱柱分离,并最终进入到 Quattro Premier XE 串联四极杆质谱中进行检测,预处理柱则平衡准备下一次进样。切换过程示于图 1。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Waters Alliance 2695/Quattro Premier XE 串联四极杆液-质联用仪;美国 Waters 公司产品,配有 Waters 1525 高压二元泵,Mass Lynx V4.1 软件,十通切换阀。

对照品:由中国药品生物制品检定所提供;内标吗啡 ds:美国 Cerilliant 公司产品。

乙腈、甲醇、甲酸、甲酸铵(色谱纯):购自德国 Merck 公司;其他试剂均为国产分析纯;水为自制超纯水。

储备液:固体对照品配成 1.0 g/L 甲醇溶液,再按照浓度配成混合稀释液。内标配成浓度为 0.1 g/L 甲醇溶液。

1.2 仪器条件

1.2.1 液相色谱条件 1) 预处理柱型号: Oasis HLB 2.1 mm \times 20 mm \times 25 μ m;预处理柱柱温:室温;预处理流动相:水;流速:1.0 mL/min;切换时间:0.60~3.00 min。2) 分析柱型号:Xterra MS C₁₈ 2.1 mm \times 150 mm \times 3.5 μ m;分析柱柱温:35 $^{\circ}$ C;分析流动相 A:2 mmol/L 甲酸铵和 0.05% 甲酸的水溶液(0.126 g 甲酸铵和 500 μ L 甲酸,加水至 1 000 mL);分析流动相 B:2 mmol/L 甲酸铵和 0.05% 甲酸的乙腈(0.126 g 甲酸铵和 500 μ L 甲酸溶于 40 mL 水中,加入 960 mL 乙腈);流速:0.2 mL/min;梯度洗脱:0 min 90% A 10% B, 5 min 90% A 10% B; 7 min 40% A 60% B, 12 min 40% A 60% B, 12.05 min 90% A 10% B;进样量:100 μ L。

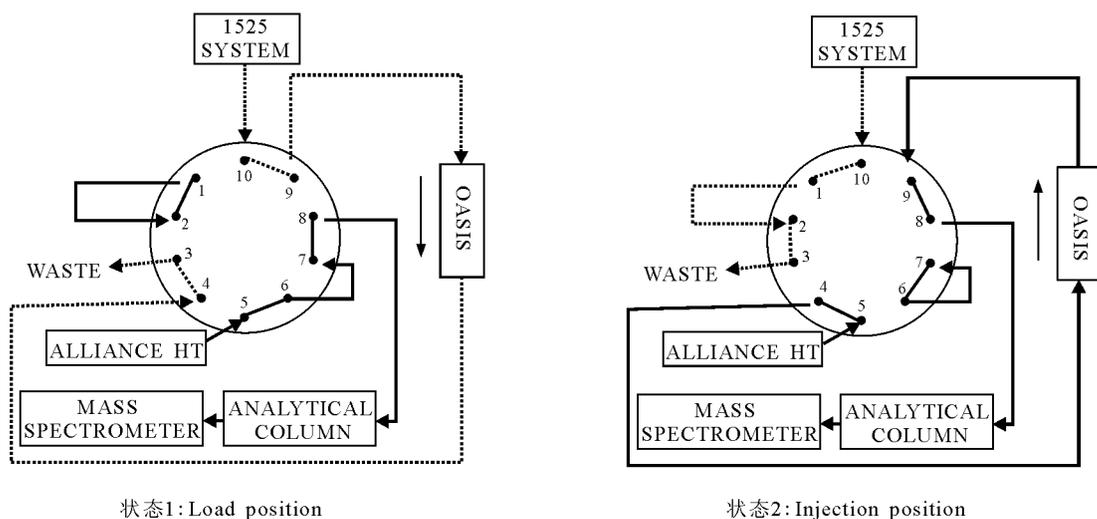


图 1 柱切换过程示意图

Fig. 1 Schematic representation of the column switching set up

1.2.2 质谱条件 多反应监测(MRM)模式, 正离子扫描, 电喷雾电压 3 200 V, 雾化气(N₂) 流速 600 L/h, 锥孔反吹气(N₂) 流速 50 L/h, 离

子源温度 105 °C, 碰撞气为氩气。

1.2.3 MRM 参数 每个化合物设 2 对母离子-子离子对, 各参数列于表 1。

表 1 吗啡、*O*⁶-单乙酰吗啡、可待因、乙酰可待因及内标的质谱 MRM 参数

Table 1 Mass spectrometric parameters and diagnostic ions for morphine, *O*⁶-monoacetylmorphine, codeine, acetylcodeine and morphine d₃

药物名称	保留时间/min	母离子/(<i>m/z</i>)	子离子/(<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	碰撞电压/eV
吗啡(Morphine)	6.01	286.1	165.1 153.1	50	38 42
吗啡 d ₃ (Morphine d ₃)	6.01	289.1	165.1 153.1	50	38 42
可待因(Codeine)	7.69	300.2	215.2 165.1	45	28 38
<i>O</i> ⁶ -单乙酰吗啡 (<i>O</i> ⁶ -Monoacetylmorphine)	9.58	328.2	211.2 165.1	50	25 38
乙酰可待因(Acetylcodeine)	10.80	342.2	165.1 225.2	43	45 28

2 结果

2.1 色谱图

吗啡、*O*⁶-单乙酰吗啡、可待因、乙酰可待因及内标在选定的液相色谱分析条件下, 保留时间

分别为 6.01、7.69、9.58、10.80、6.01 min, 色谱行为良好, 总离子流色谱图示于图 2。

2.2 检测限

当信噪比(*S/N*)为 3 时, 各化合物的检测限列于表 2。

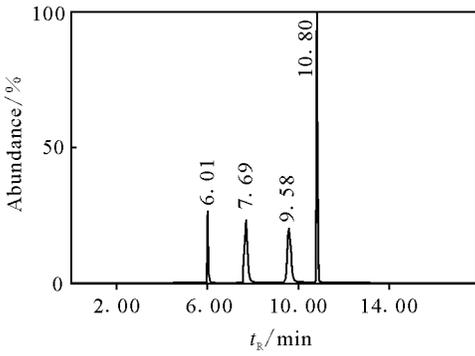


图 2 吗啡、*O*⁶-单乙酰吗啡、可待因、乙酰可待因及内标的总离子流色谱图

Fig. 2 TIC of morphine, *O*⁶-monoacetylmorphine, codeine, acetylcodeine and morphine *d*₃

表 2 吗啡、*O*⁶-单乙酰吗啡、可待因、乙酰可待因的检测限和线性关系

Table 2 The limit of detection, linear equation and coefficient of morphine, *O*⁶-monoacetylmorphine, codeine, and acetylcodeine

药物名称	检测限/($\mu\text{g/L}$)	线性范围/($\mu\text{g/L}$)	线性方程	相关系数
吗啡	1	1~ 10 000	$y = 0.012\ 014\ 2x + 0.164\ 173$	0.999 712
<i>O</i> ⁶ -单乙酰吗啡	1	1~ 10 000	$y = 0.057\ 381\ 4x + 0.520\ 135$	0.999 538
可待因	1	1~ 10 000	$y = 0.042\ 998x + 1.073\ 72$	0.999 464
乙酰可待因	0.3	1~ 10 000	$y = 0.095\ 223\ 1x - 4.727\ 1$	0.999 151

表 3 吗啡、*O*⁶-单乙酰吗啡、

可待因、乙酰可待因的日内及日间精密度

Table 3 Intra and inter day precision of morphine, *O*⁶-monoacetylmorphine, codeine and acetylcodeine

药物名称	浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	日内精密度 RSD/ % ($n=6$)	日间精密度 RSD/ % ($n=4$)
吗啡	30	1.84	2.53
	100	1.43	4.04
	300	1.06	3.73
<i>O</i> ⁶ -单乙酰吗啡	30	3.09	1.97
	100	1.33	2.41
	300	3.64	4.00
可待因	30	1.79	1.16
	100	1.99	3.09
	300	2.78	3.55
乙酰可待因	30	3.42	1.78
	100	2.14	3.47
	300	2.62	3.62

2.3 线性关系和精密度

分别取不同量的对照品混合液于具塞尖底试管中,吹干后加入空白尿样配成系列浓度的样品。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,得到回归方程和相关系数,各化合物的线性关系良好(表 2)。高、中、低浓度日内重复测定 6 次得日内精密度,连续测定 4 天得日间精密度,列于表 3。

2.4 案例应用

本方法已经应用于多起实际案件的吸毒尿样分析,其中一例吸毒致死案件的尿样检材中检出吗啡、*O*⁶-单乙酰吗啡、可待因、乙酰可待因成分,色谱图示于图 3。

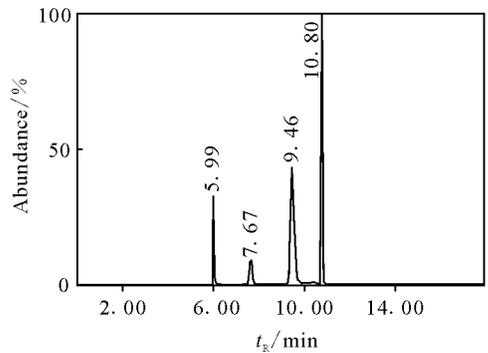


图 3 一例吸毒致死案件的尿样色谱图

Fig. 3 Chromatogram of a case

3 讨论

在线固相萃取(SPE)的主要优点有:1)前处理简单,自动化操作,样品只需简单处理或不经处理即可进样分析,因此也适用于不稳定药物的分析;2)富集被测组分,提高了分析灵敏度,尤其是水溶性较大的组分,无法用液-液萃取时,HPLC柱切换技术则很有效;3)由于进样体积

较大, 处理样品的全过程由仪器程序控制, 可获得很高的精密度与重现性。

采用柱切换方法, 切换时间的确定至关重要。通过实验确定预处理流动相的冲洗时间, 初始为状态 1, 预处理柱和分析柱是并联状态, 进样后各化合物富集、保留在预处理柱上, 0.60 min 后切换到状态 2, 既可除去尿液中的水溶性杂质和盐类, 又使峰面积达到最大化, 时间增加或者减少峰面积均减小。在状态 2 时, 预处理柱和分析柱串联在一起, 分析流动相将保留在预处理柱上的化合物洗脱进入分析柱, 3.00 min 后回到状态 1, 化合物继续在分析柱上完成分离, 时间增加峰面积不再增加, 仅保留时间延长, 因此确定切换时间为 0.60~3.00 min。

液相色谱分析条件的确定: 以乙腈和水作为流动相主体, 由于样品离子化的需要, 在水中需要加入甲酸和甲酸铵, 其中甲酸主要起到改善峰形的作用, 甲酸铵可以提高仪器信号的响应值。由于梯度洗脱会影响色谱峰面积的稳定性, 通过在乙腈中加入相同浓度的甲酸和甲酸铵, 保证梯度变化过程中甲酸和甲酸铵的浓度一致, 改善了色谱峰面积的稳定性。吗啡类生物碱水溶性较大, 在色谱柱上不易保留, 由于母体结构相似, 碎

片离子也相同, 为了方法定性定量的准确性, 避免相互干扰, 有必要使分析的化合物能在保留时间上分开, 于是采用了初始为 10% 水相的梯度洗脱, 各化合物得到良好的分离。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 朱彬玲. 尿中 O^6 -乙酰吗啡的膜式固相萃取及 GC/MS/SIM 测定[J]. 漳州师范学院学报, 2007, 20(2): 88-91.
- [3] 吕海茹. 尿中吗啡常见检测方法[J]. 刑事技术, 2008, 2: 29-31.
- [4] 梁 晨, 郭幼梅, 金琦芸, 等. 柱切换高效液相色谱法测定尿中苯骈二氮杂卓类药物[J]. 中国临床药理学杂志, 2003, 12(3): 157-160.
- [5] JAGERDEO E, MONTGOMERY M A, LEBEAU M A, et al. An automated SPE/LC/MS/MS method for the analysis of cocaine and metabolites in whole blood[J]. Journal of Chromatography B, 2008, 874(1/2): 15-20.
- [6] 向 平, 沈 敏, 沈保华, 等. 生物检材中吗啡类生物碱的 LG MS/MS 分析[J]. 法医学杂志, 2006, 22(1): 52-57.

(上接第 158 页)

- [18] 王 婉, 刘咸德, 鲁毅强, 等. 北京冬季大气颗粒物中铅的同位素丰度比的测定和来源研究[J]. 质谱学报, 2002, 23(1): 21-29.
- [19] CHEN J M, LI Y L, ZHANG Y M, et al. A lead isotope record of Shanghai atmospheric lead emissions in total suspended particles during the period of phasing out of leaded gasoline[J]. Atmospheric Environment, 2005, 39(7): 1245-1253.
- [20] 中国有色冶金工业年鉴编辑委员会. 中国有色冶金工业年鉴(2004年)[M]. 北京: 中国有色金属工业协会, 2004: 483.
- [21] 刘咸德, 李玉武, 董树屏, 等. 北京市大气颗粒物化学元素组成的聚类分析[J]. 质谱学报, 2010, 31(3): 156-164.
- [22] 刘咸德, 董树屏, 郭冬发, 等. 基于化学和同位素数据表征复合型大气铅污染过程[J]. 质谱学报, 2004, 25(1): 6-11.