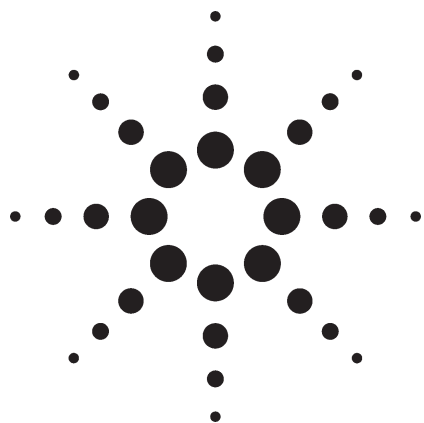




液相色谱 / 电喷雾 - 质谱联用 检测血液中的镇静剂及其代谢物

——药物分析

Scott A. Schlueter and James D. Hutchison, Jr
Montana Department of Justice, Division of Forensic Science

前言

镇静剂(如图 1 所示)是一种被广泛滥用的药物,他们可以通过非法的渠道和处方的渠道获得。海洛因的第一个代谢物是 6-乙酰吗啡。它通常是作为检测海洛因的标记化合物。现有的成熟分析方法是气-质联用法,但是需要进行衍生化反应^[1]。但是衍生化可能会增加分析过程的变数。

电喷雾质谱对镇静剂及其代谢物化合物的分析具有极高的灵敏度,而且无须进行衍生化反应。用于临床试验中血液样品的液-质分析方法中使用的固相柱同样可以被用于法医分析工作中。一般情况下,法医方面的血样中的镇静剂的浓度都较高,因此全扫描模式就足以,

不需要选择离子扫描模式。因此在同一次分析中除了对目标镇静剂化合物进行定量分析之外,还可以检测其它的违禁药物。电喷雾-质谱对上述化合物的分析,其结果的准确性和精确度均优于气-质方法。

实验方法

分析系统是 Agilent 1100 液相色谱 / 质谱联用仪。液相色谱包括二元泵,真空脱气机,自动进样器,柱温箱液带柱切换阀,二极管阵列检测器;质谱为 1100VL 四极杆质谱仪,同时配有电喷雾(ESI)离子源。二极管阵列检测器主要用于方法的建立。整个系统由 Agilent 液-质化学工作站进行数据采集及分析。



Agilent Technologies

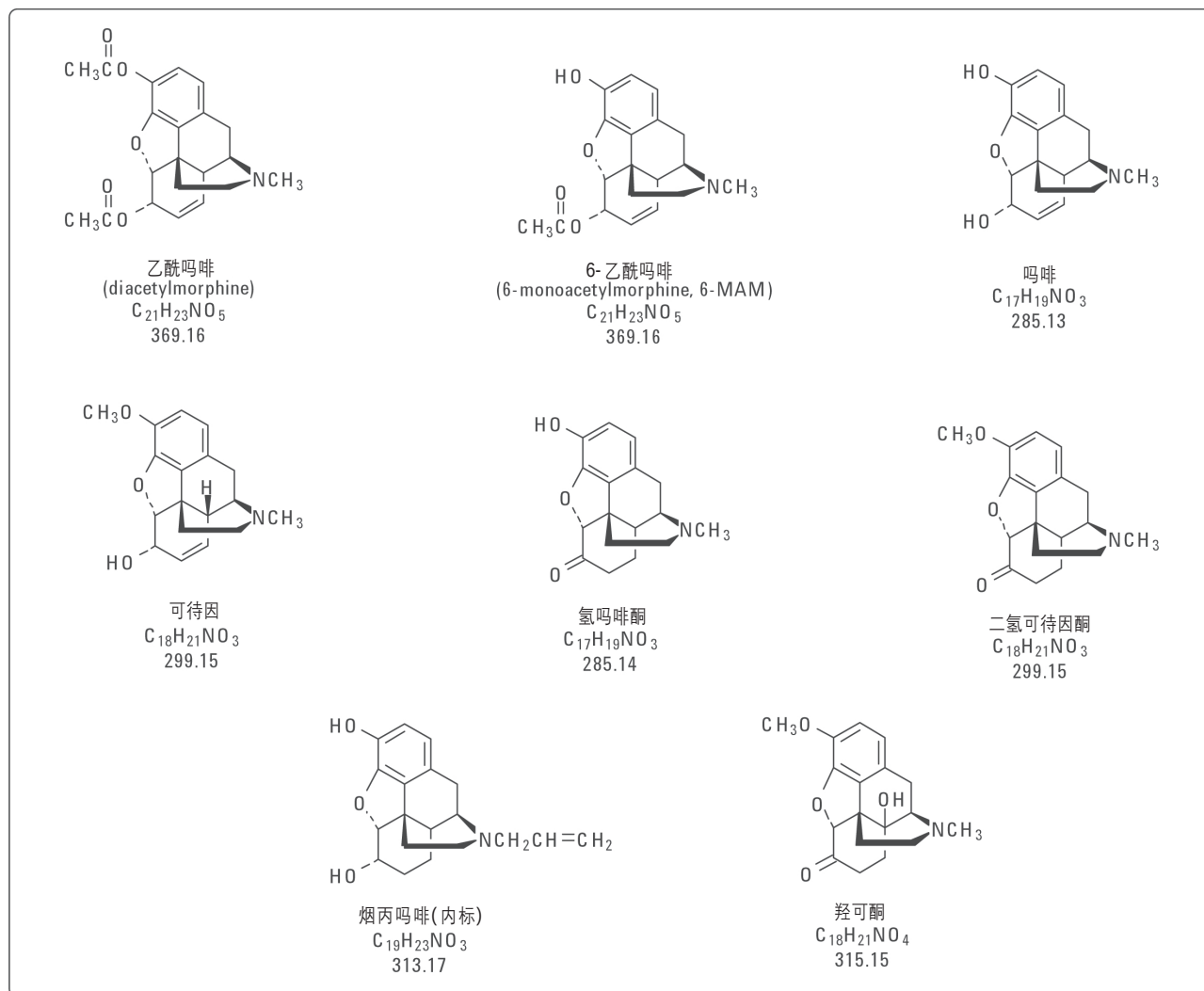


图1. 镇静剂和内标物的化学结构

所有的标样都是从 Cerilliant 公司(前身是 Radian Analytical Products)购买的。建立可同时定性和定量分析方法的目的是希望在检测中不使用稳定同位素内标。选择烟丙吗啡是因为在本实验室中它已经被用于气-质法的内标物。

空白血样添加已知浓度的镇静剂和内标。试管用盖盖紧,混和,在 37℃ 下恒温 12 小时。样品血样(1 毫升)添加内标(1 mg/ml)。混和,平衡 30 分钟。于每一个样品,

加入 2 毫升 pH 9 的 10 mM 碳酸铵缓冲液。样品混合之后,在 3000 rpm 下离心 10 分钟。

固相萃取柱(CEC18156, United Chemical Technologies)顺序用 2 毫升甲醇和 2 毫升去离子水,然后用 2 毫升碳酸铵缓冲液活化。离心之后的上清液倒入活化好的固相萃取柱,让液体自然流下,通过固相萃取柱。

固相萃取柱在真空下保持 5 分钟，然后用 3 毫升甲醇洗脱目标化合物。甲醇洗脱液在 40℃ 下，用氮气吹干。残渣用 50 微升流动相定容，然后转入 1 毫升离心管中，在 15000rpm 下离心 2 分钟。10 微升样品进入液－质进行分析。

应该注意，在上面的样品制备中，吗啡－3－葡萄糖苷酸和吗啡－6－葡萄糖苷酸也被萃取出来。但是，各种镇静剂葡萄糖苷酸共轭体的标样很难获得，因此，可以选择水解来处理样品。1 毫升血样加入 100 微升浓度为 1000 单位／毫升溶液(pH=2.5)的β－葡萄糖苷酸酶(是从 *Patella vulgata* 提取而来)进行处理。对于未知的样品分析，若分析显示存在镇静剂或苯二氮杂突(benzodiazepine)，则使用实验室标准操作程序水解样品。

在样品分析时，很重要的一点是必须分开同分子量的化合物，如吗啡／氢吗啡酮，可待因／二氢可待因酮)，这样才可以准确无误地得到分析结果。本实验所用的色谱条件可以完全分离各种镇静剂化合物，但是须使用梯度洗脱的色谱条件。结果显示，峰的保留时间在一段时间内的重复性很好。

质谱参数包括碎片电压，毛细管电压，喷雾室参数都已进行了优化。

分析方法	
色谱条件	
分析柱：	Supelco Discovery HSC18; 3 μm, 4.6 mm x 150 mm
流动相：	A=0.1% 甲酸水溶液 B= 甲醇
梯度：	0 分钟 5% B; 2 分钟到 5% B; 10 分钟到 90% B; 20 分钟 90% B
流速：	0.5 ml/min
柱温：	50℃
进样体积：	10 微升
二极管阵列检测器：	检测波长 214 nm, 8; 参比波长: 360 nm, 100;
质谱：	
电喷雾(ESI)：	正离子模式
毛细管电压：	3000 V
干燥气：	氮气，13 L/min, 3500C
雾化气：	氮气，50 psi
碎片电压：	120 V
质量范围：	100-650 amu
步长(stepsize)：	0.1
峰宽(peak width)：	0.12 分钟
时间过滤(time filter)：	on
用于确认和定量的离子：	
烟丙吗啡(内标)：	<i>m/z</i> 312
吗啡，氢吗啡酮：	<i>m/z</i> 286
可待因 / 二氢可待因酮：	<i>m/z</i> 300
6- 乙酰吗啡：	<i>m/z</i> 328
羟可酮：	<i>m/z</i> 298

结果与讨论

实验方法的回收率很高，从 6－乙酰吗啡的 85% 到吗啡的 100%。图 2 所示为六个镇静剂及内标的萃取离子流图。

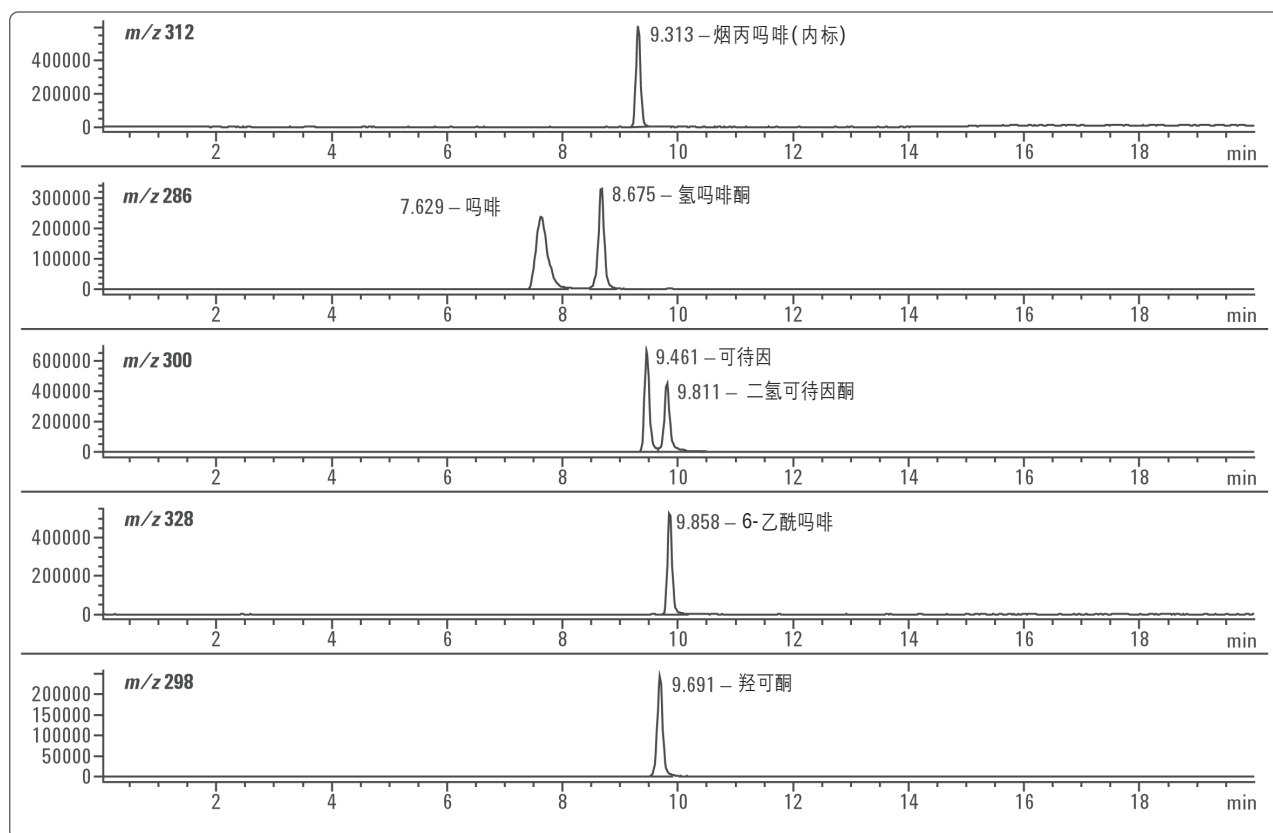


图2. 六个镇静剂及内标的萃取离子流图.

图3所示为空白血样添加内标(1000 ng/ml)的萃取离子流图。图4所示为控制血样添加标样(250 ng/ml)的萃取离子流图。

对所有的分析目标化合物,校正范围是0.05 mg/ml至0.75 mg/ml。在此浓度范围内,校正曲线呈线性响应。

对于六个目标化合物的校正曲线的线性相关性(r^2)大于0.99。质控样品 (n=10)为血样添加每一个目标化合物的浓度为0.25 mg/L,结果如表1所示。变异系数一般小于5%,定量分析的结果在5%之内(其中4个化合物小于1%)。

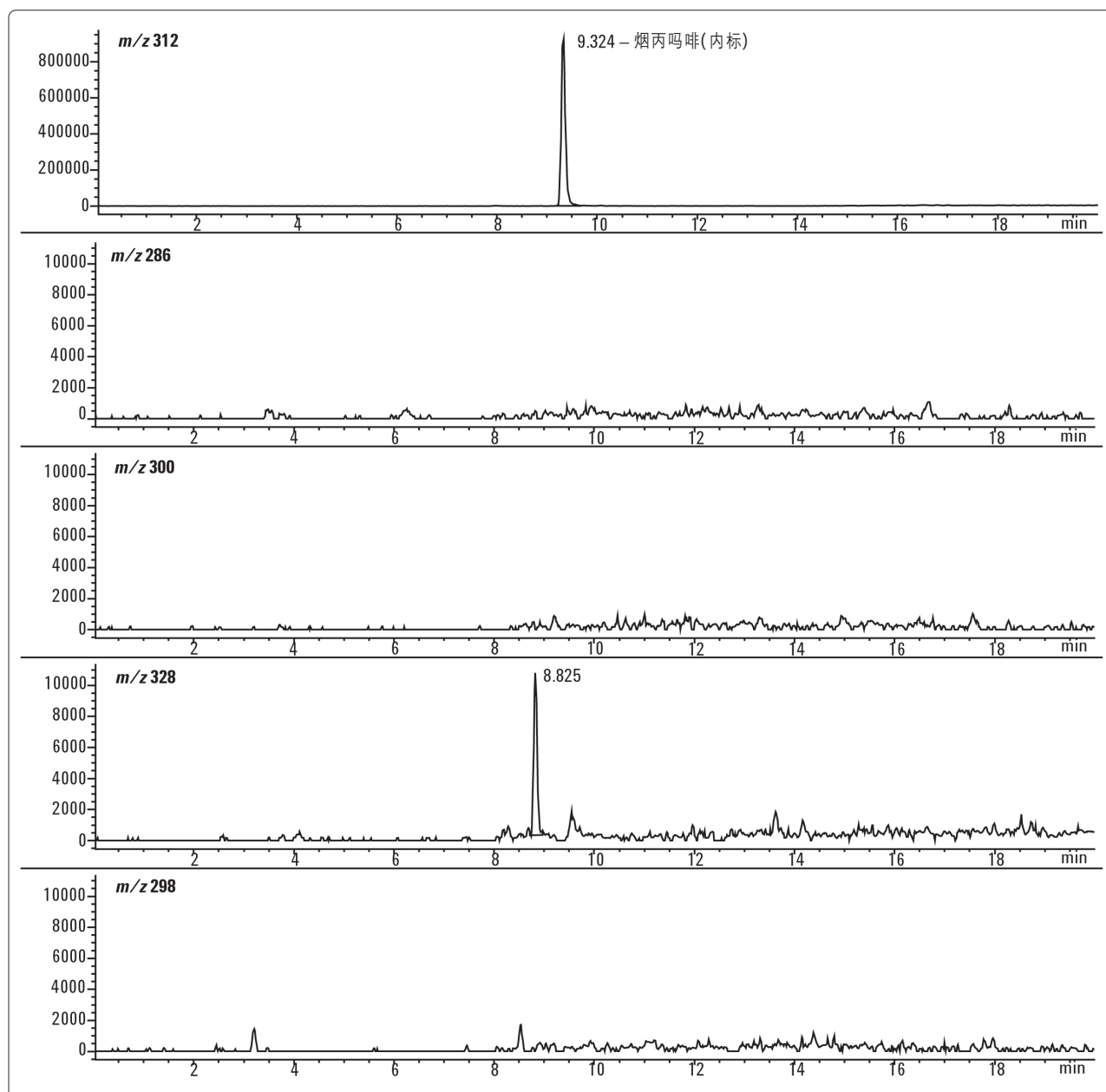


图 3. 空白血样添加内标(1000 ng/ml)的萃取离子流图

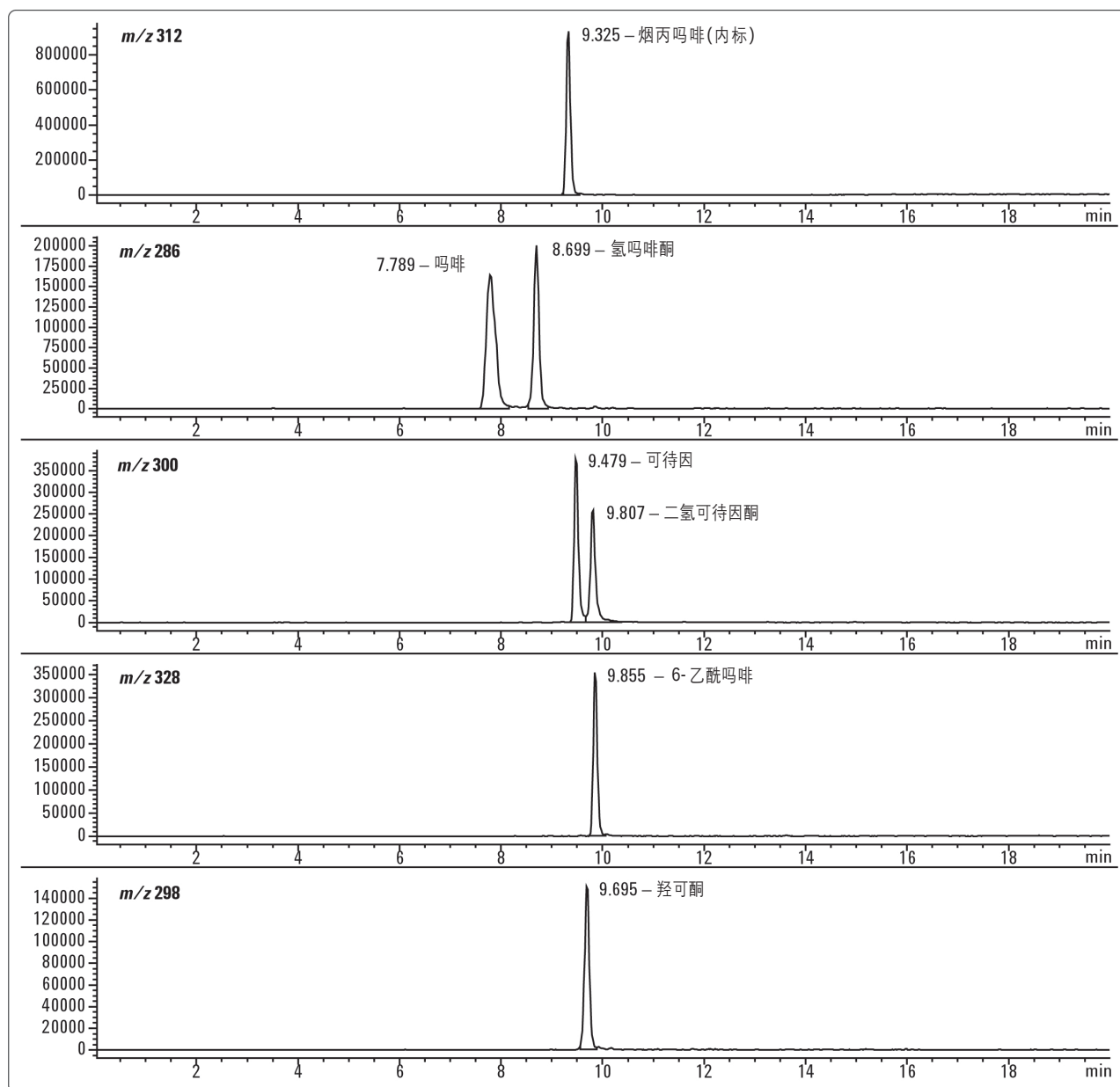


图4. 控制血样添加标样(250 ng/ml)的萃取离子流

表 1. 分析方法的精确度和准确度. 目标化合物的浓度为本 0.25 mg/L

	morphine	hydromorphone	codeine	hydrocodone	6mam	oxycodone
	0.248	0.254	0.251	0.239	0.253	0.247
	0.247	0.245	0.239	0.242	0.249	0.254
	0.250	0.254	0.269	0.252	0.260	0.275
	0.267	0.249	0.246	0.245	0.230	0.264
	0.254	0.242	0.252	0.245	0.244	0.257
	0.251	0.246	0.249	0.241	0.248	0.267
	0.247	0.251	0.245	0.237	0.255	0.252
	0.258	0.259	0.256	0.250	0.258	0.263
	0.249	0.253	0.244	0.246	0.252	0.263
	0.254	0.256	0.261	0.249	0.259	0.287
平均	0.253	0.251	0.251	0.245	0.251	0.263
标准偏差	0.00942	0.00436	0.0128	0.00557	0.0128	0.0122
变异系统	3.729	1.737	5.102	2.276	5.117	4.638
百分比误差	1.00%	0.36%	0.48%	-2.16%	0.32%	5.16%

1 Coefficient of variation = (standard deviation/mean) x 100;

2 percent error = (mean-target)/target x 100

图5为血样镇静剂呈阳性的样品的分析结果, 样品是从一位已死亡的 48 岁的女子身上取得的。她有长期服药的历史, 而且最近接受过吗啡硫酸盐和 Dilaodid 的处方。检测结果表明, 其样品中的吗啡浓度为 0.84 mg/L 和总氢吗啡酮的浓度为 0.08 mg/L。

另一个阳性样品(如图5所示)是来自于一个在朋友公寓中昏迷的 40 岁男子的血液, 在他的衣服口袋中发现了羟可酮。经调查发现, 此男子患有肝炎及具有滥用药物的历史。经检验发现, 羟可酮的浓度为 0.23 mg/L, 可待因未进行定量分析, 因为其浓度低于校正曲线的下限(0.05 mg/L)。

第三个案例: 一位41岁的女子被发现死在汽车旅馆里, 在她的手上发现有注射器, 在洗手间发现一小包麻醉剂。取其血样, 用液-质分析发现, 总吗啡浓度为 0.05 mg/L, 可以确定有 6-乙酰吗啡和可待因。

此方法的定量限的规定仍然在制订中, 然而方法的灵敏度可以达到 0.01 mg/L(10ng/ml)。

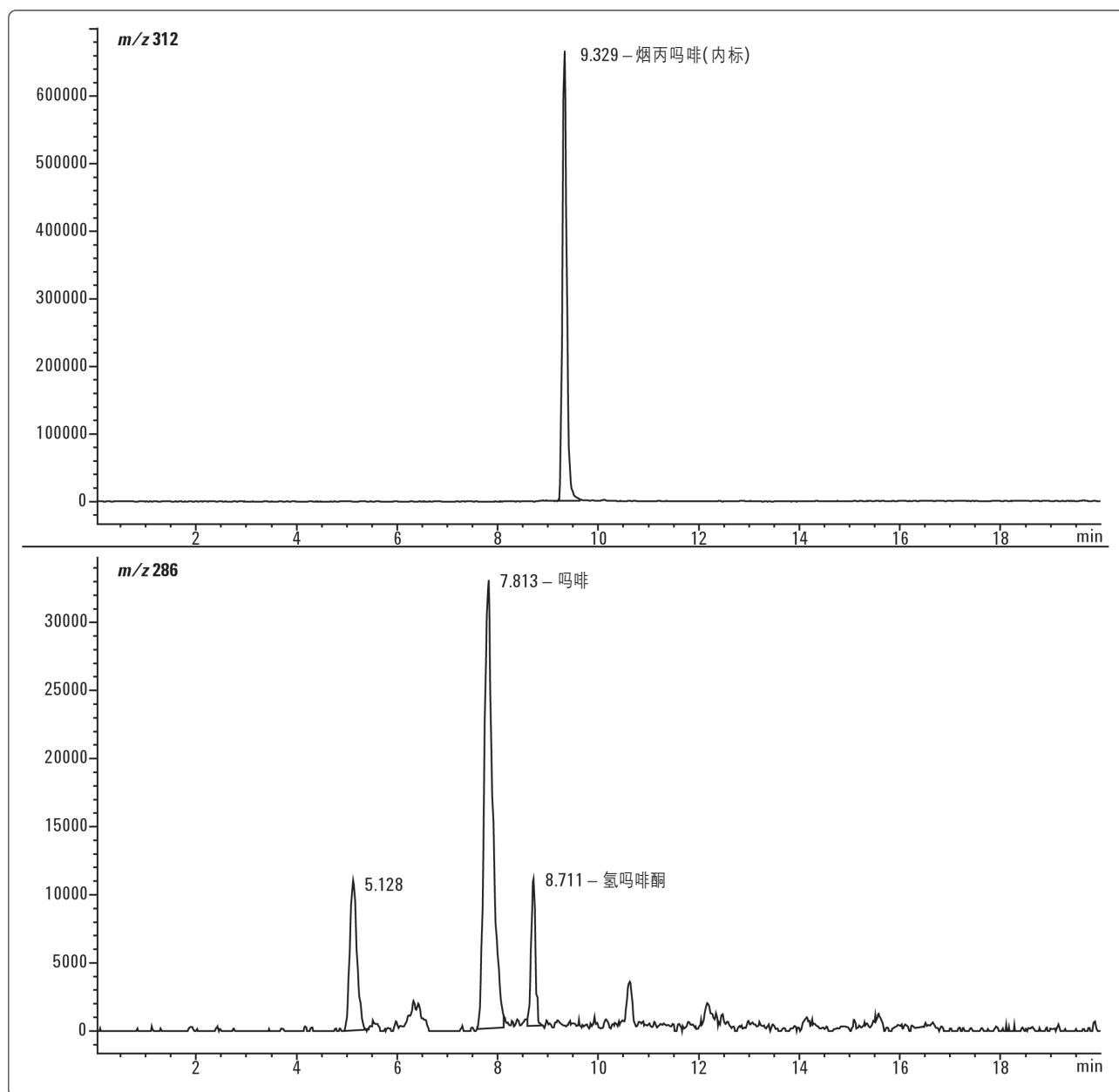


图5. 发现含有吗啡和氢吗啡酮的血样样品的萃取离子流

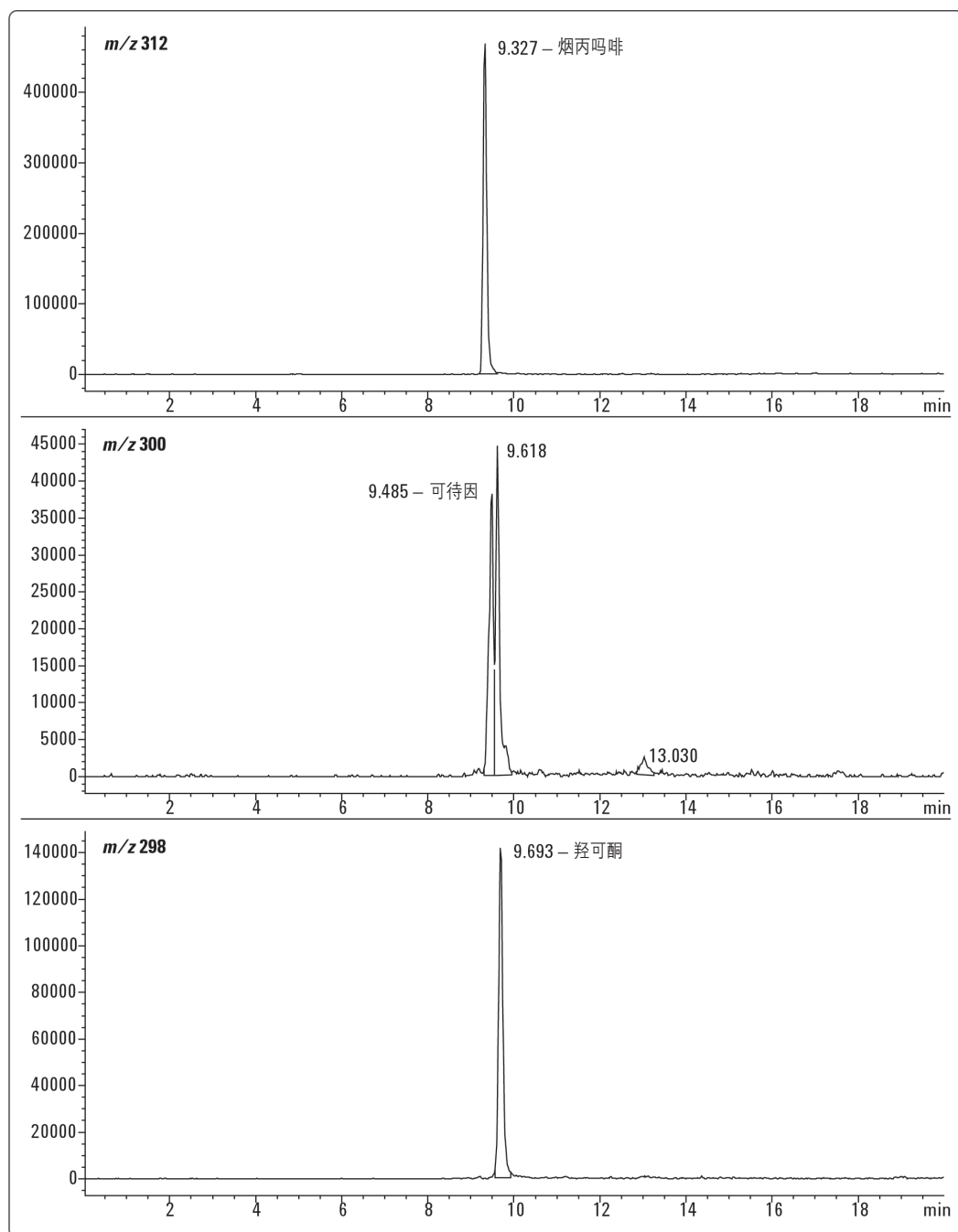


图 6. 发现含有羟可酮和可待因的血样样品的萃取离子流

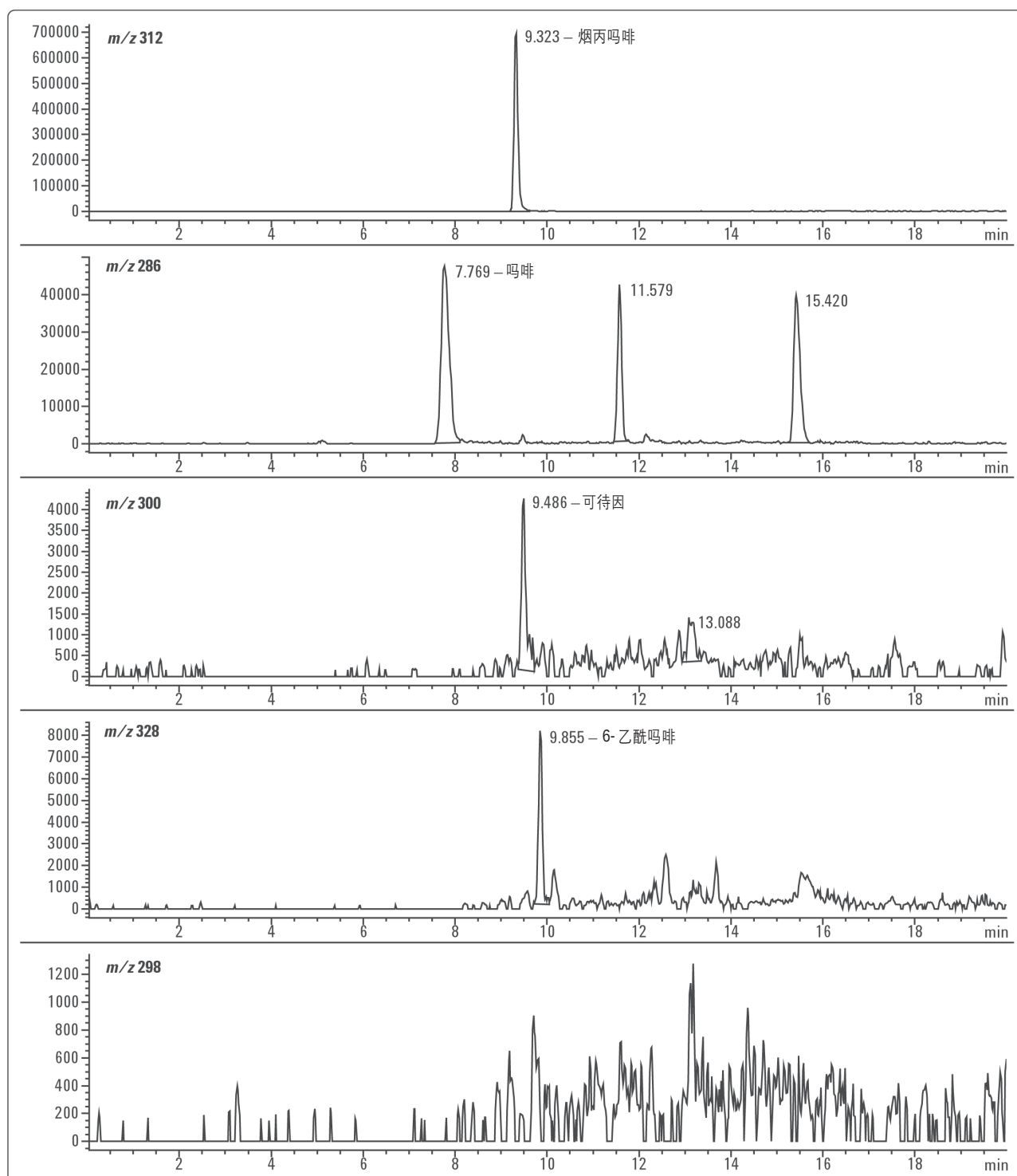


图 7. 发现含有吗啡, 可待因和 6-乙酰吗啡的血样样品的萃取离子流

结论

上述的结果表明,液相/电喷雾-质谱是分析检测血样中镇静剂药物的可靠方法。目前确认条件的线性范围是0.05–0.75 mg/L,其准确度和精确度都与目前成熟的分析方法(气-质法)相当。在样品制备中使用的固相萃取小柱与一般法医分析使用的 SPE 小柱相同而且无需衍生化反应。与现有的气-质法相比,液-质方法更加简单。除此之外,LC/MSD VL 可以采用全扫描模式采集数据,其结果的精确度或准确度都很高,因此本方法既可以用常规扫描分析又可以进行目标化合物定量分析。

参考文献

1. L.A. Broussard, L.C.Presley, T.Pittman, R. Clouette, and G.H. Wimbish. Simultaneous identification and quantitation of codeine, morphine, hydrocodone, and hydromorphone in urine as trimethylsilyl and oxime derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chem.* 43, 1029–1032 (1997)
2. Matthew H. Slawson, Dennis J. Crouch, David M. Andrenyak, Douglas E. Rollins, Jeffry K. Lu, and Peter L. Bailey, Determination of Morphine, Morphine-3-glucuronide, and Morphine-6-glucuronide in Plasma after Intravenous and Intrathecal Morphine Administration Using HPLC with Electrospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 23, 468–473 (1999).

www.agilent.com/chem

安捷伦科技公司对本材料可能存在的错误或装置、性能及材料使用有关内容而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本资料中的信息,如有改变,恕不另行通知。

安捷伦科技公司版权所有 ©, 2001

2002 年 6 月 5 日中国印刷
出版号: 5988-4805 CHCN



Agilent Technologies