

固相萃取结合 GC-MS 系统分离分析生物体液中常见毒物药物

李莉*, 周永新, 罗毅

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 研究生物体液中 7 类 47 种常见毒物药物的系统分离分析方法。方法 选用通用性较好的新型紧压式三相混合填料的固相萃取柱(SPEC Multi-Modal), 采用酸性和碱性两步洗脱, 建立同时提取血浆中几十种具不同理化性质的酸性、中性和碱性药物的系统化固相萃取方法。GC-MS 系统分析方法将色谱系统的保留性质和质谱系统的特征离子、谱库检索相结合实行多指标定性。利用所选的每类药物及其代谢物代表碎片离子的质量色谱, 对几类药物及其代谢物进行筛选。结果 测定了 21 种常见药物毒物在血浆中的绝对回收率, 回收率均在 78% 以上, 相对标准偏差小于 7% ($n=5$)。所建系统分析方法对急性中毒病人进行了定性定量分析, 取得满意的结果, 使方法在实际应用中得到了验证。结论 此方法系统性强、选择性好、灵敏度高, 结果可靠。

关键词: 固相萃取法; 多相混合固相萃取柱; GC-MS; 系统分析; 毒物药物

中图分类号: R991; R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2000)07-0521-05

本实验室在日常工作中所面临的常常是生物体液中未知毒物的鉴别鉴定。由于未知毒物的范围非常广泛, 理化性质各异, 因此, 有必要建立一系统化的药物毒物分析方法, 该方法应包括尽可能多的药物毒物, 以便快速、有效地得到分析结果, 为急救、预防和刑事侦破提供依据。

生物体液中药物毒物的 GC-MS 检测中, 样品的前处理是一项重要工作, 样品提取效果的好坏直接影响分析的灵敏度和可靠性。SPE 与 LLE 相比, 有操作简单、易规范化、有机溶剂用量小、提取干净和快速等优点。近年来, 由于混合填料萃取柱的发展, 可通过一种 SPE 柱同时提取多种不同理化性质的药物^[1,2]。本文选用一种新型的紧压式三相混合填料固相萃取柱, 建立了生物体液中几类常见药物毒物的 GC-MS 系统分析方法, 方法系统性强、快速、灵敏、可靠。此法在常规中毒样品分析及成瘾者的临床检验及治疗监测方面有实际应用价值。

材 料 和 方 法

仪器与试剂 药物包括巴比妥类(6 种)、苯二氮䓬类(5 种)、三环类和吩噻嗪类(9 种)、局麻药(10 种)、麻醉镇痛药(10 种)、苯丙胺类中枢兴奋剂(4

种)、烟草(1 种)以及其他(2 种)共 7 类 47 种常见毒物药物。其中局麻药购自 Sigma; 内标正二十一烷购自 Lancaster; 麻醉镇痛药和苯丙胺类中枢兴奋剂购自国家麻醉品实验室; 其余药物均来自公安部二所。用甲醇配成 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 4°C 保存。实验前用甲醇稀释成所需工作浓度。其他试剂均为分析纯或色谱纯。

气相色谱-质谱联用仪(HP-5890 II 气相色谱仪, VG TRIO-1000 型质谱仪), 配有 HP-5 毛细管色谱柱($25 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm} \times 0.52 \mu\text{m}$)。HP-5890 II 气相色谱仪, 毛细管色谱柱 BP-5($25 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm} \times 0.52 \mu\text{m}$), FID 检测器。真空固相萃取装置(美国, Supelco 公司)。固相萃取柱(SPEC-PLUS-10 mL C_{18} AR/MP3 Multi-Modal, 美国 ANSYS Inc.) 由香港大诚太平洋有限公司提供。

$0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸溶液: 冰乙酸 0.6 mL 定容于 100 mL 去离子水。酸性洗脱剂: 乙酸乙酯 100 mL 中加入冰乙酸 100 μL 。碱性洗脱剂: 乙酸乙酯 98 mL 中加入浓氨水 2 mL。

样品处理及提取 取血浆 0.5 mL, 加入一定量待测药物, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸液 2.0 mL 稀释, 涡旋混匀 30 s, 待用。提取程序: ① 固相萃取柱编号, 装在真空萃取装置上。② 萃取柱用甲醇 0.5 mL 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸液 1.0 mL 预处理。③ 将准备好的样品以约 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速过柱。④ 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸液 1.0 mL 冲洗萃取柱, 然后调节萃取

装置的压力约为 50 kPa,干燥柱子 5 min。再用正己烷 0.5 mL 冲洗后,相同压力下干燥 5 min。⑤用酸性洗脱剂 0.5 mL 洗脱 2 次,流速约为 1.5 mL·min⁻¹,收集酸性洗脱液。⑥用碱性洗脱剂 1.0 mL 洗脱 2 次,流速约为 0.5 mL·min⁻¹,收集碱性洗脱液。⑦混合酸性和碱性洗脱液,加入含内标正二十一烷 2 μg 的甲醇溶液,旋转蒸干,加入乙酸乙酯 100 μL 定容。

回收率测定 在空白人血浆 0.5 mL 中加入不同量的药物,使药物浓度分别为 20 和 5 μg·mL⁻¹,按前述方法处理后,用 GC-FID 对加入到血浆中的药物进行回收率测定,与同浓度的对照品进行比较,计算药物在血浆中的绝对回收率。GC-FID 分析条件如下:BP-5 毛细管柱,进样口温度 280 °C,检测器温度 280 °C,分流比 7:1,炉温设为:起始温度 150 °C,升温速率 15 °C·min⁻¹,终止温度 280 °C,保持 10 min。进样 1~2 μL,计算药物与内标的峰面积比,以此为标准计算药物在血浆中的绝对回收率。

常见药物毒物 GC-MS 系统分析方法 气相色谱条件:初始柱温 80 °C,升温速率 15 °C·min⁻¹,终止温度 270 °C,保持 10 min;进样口温度 250 °C;载气用氦气,柱前压为 80 kPa;进样采用不分流方式。质谱分析条件:EI 源,全扫描方式,离子源温度 200 °C,传输线温度 250 °C,电子轰击能量 70 eV,光电倍增器电压 500 V,扫描范围和速度:50~650 amu·s⁻¹,扫描间隔:0.1 s。

标准品和实际样品按上述条件直接进样 1~2 μL 分析。

结果与讨论

1 常见毒物药物 GC-MS 系统分析方法

1.1 GC-MS 条件参数的确立 为了使 47 种常见毒物药物在色谱柱上获得最佳分离,详细比较了气相色谱程序升温条件,最后选择了进样口温度为 250 °C,初始柱温 80 °C,升温速率 15 °C·min⁻¹,终止温度 270 °C,保持 10 min。47 种常见毒物药物和内标正二十一烷在此条件下的 GC-MS 数据见表 1。

在此条件下仍有几对化合物分离不好,如丙咪嗪和多虑平,吗啡、布它卡因和安定,丁氧卡因和可待因,泰尔登和氯丙嗪,利眠宁和乙酰可待因,6-乙酰吗啡和蒂巴因,但可以利用 GC-MS 的差谱技术将它们分别鉴定,如图 1 所示。

1.2 GC-MS 的多指标定性 化合物的特征离子和质谱图是质谱法结构定性的基础,但在分析过程中,发现一些化合物有相同的特征离子,质谱图类似,在此情况下,只根据特征离子和谱库检索而定性有一定困难。保留性质的差异是色谱法定性的基础,GC-MS 同样也是一个很重要的定性指标。为了充分发挥 GC-MS 的功能,本文结合保留时间、相对保留时间、特征离子以及谱库检索对药物实行多指标定性。

1.3 质量色谱法在药物及其代谢物系统分析中的应用 一种药物在体内经生物转化可产生几种代谢物,有些药物甚至被完全代谢,检测不到原型药物。因此,在生物体液的检测工作中,代谢物的鉴定是一项重要工作。

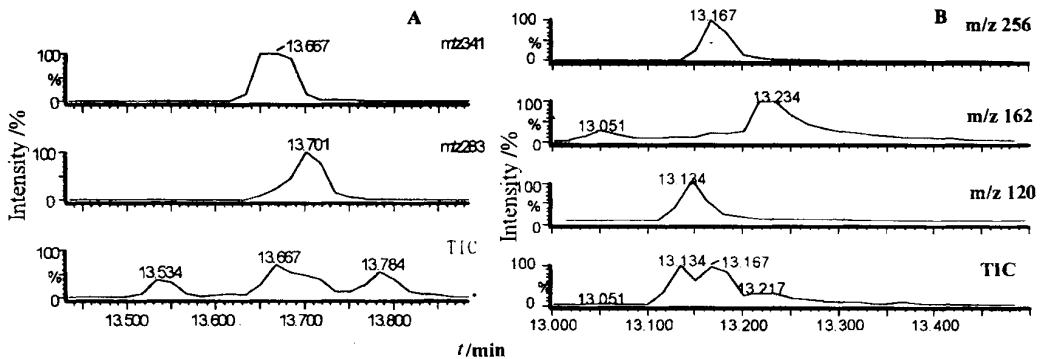


Fig 1 Using reconstructed chromatograms of characteristic ions to individually identify the overlapped peaks in total ion chromatogram

A. Acetyl codeine (m/z 341) and chlordiazepoxide (m/z 283); B. Butacaine (m/z 120), morphine (m/z 162) and diazepam (m/z 256)

Tab 1 Retention times (RT), relative retention times (RRT), molecular weights (MW) and characteristic ions of 47 drugs and one internal standard (C21), $\bar{x} \pm s$, $n = 6$

No.	Compound	RT/ min	RRT	MW	Characteristic ion
1	Amphetamine	3.03 ± 0.008	0.286 ± 0.0008	135	91, 65, 63, 120, 77
2	Methamphetamine	3.48 ± 0.012	0.328 ± 0.0011	149	58, 65, 91, 77, 117
3	Nicotine	4.96 ± 0.012	0.468 ± 0.0011	162	84, 133, 162
4	MDA	6.12 ± 0.030	0.578 ± 0.0028	179	136, 135, 77, 105, 179
5	Barbital	6.38 ± 0.012	0.602 ± 0.0012	184	141, 156, 98, 112, 83
6	MDMA	6.61 ± 0.028	0.624 ± 0.0026	193	58, 135, 193, 177
7	Aprobarbital	7.42 ± 0.018	0.700 ± 0.0017	210	167, 124, 97, 168, 195
8	Mepylcaine	7.72 ± 0.000	0.728 ± 0.0000	235	100, 105, 58, 70, 84
9	Amobarbital	8.15 ± 0.008	0.769 ± 0.0008	226	156, 141, 55, 167, 142
10	Pentobarbital	8.34 ± 0.011	0.787 ± 0.0010	226	141, 156, 98, 157, 112
11	Pethidine	8.40 ± 0.000	0.793 ± 0.0000	247	71, 103, 172, 247, 218
12	Isobutylaminobenzoate	8.57 ± 0.005	0.809 ± 0.0005	193	120, 137, 92, 65, 193
13	Secobarbital	8.73 ± 0.005	0.823 ± 0.0004	238	168, 167, 141, 97, 156
14	Caffeine	9.03 ± 0.008	0.852 ± 0.0008		194, 109, 67, 82, 55
15	Prilocaine	9.08 ± 0.000	0.857 ± 0.0000	220	86, 107, 106, 134, 220
16	Lidocaine	9.40 ± 0.000	0.887 ± 0.0000	234	86, 58, 87, 72, 120
17	Phenobarbital	10.14 ± 0.004	0.956 ± 0.0028	232	204, 232, 117, 156, 141
18	Procaine	10.46 ± 0.013	0.987 ± 0.0013	236	86, 99, 120, 58, 164
19	n-Heneicosane (IS)	10.60 ± 0.000	1.000		
20	Methadone	11.25 ± 0.008	1.061 ± 0.0008	309	72, 91, 165, 178, 294
21	Methaqualone	11.38 ± 0.000	1.074 ± 0.0000	250	91, 235, 233, 250, 132
22	Amitriptyline	11.59 ± 0.011	1.093 ± 0.0011	277	58, 59, 202, 91, 203
23	Cocaine	11.65 ± 0.000	1.094 ± 0.0000	303	82, 83, 182, 94, 105
24	Imipramine	11.77 ± 0.000	1.110 ± 0.0000	280	58, 234, 85, 235, 193
25	Doxepine	11.81 ± 0.011	1.114 ± 0.0011	279	58, 165, 178, 152, 189
26	Pramocaine	12.03 ± 0.000	1.135 ± 0.0000	293	100, 128, 70, 101, 129
27	Bupivacaine	12.15 ± 0.000	1.146 ± 0.0000	288	140, 84, 141, 96, 56
28	Promethazine	12.15 ± 0.000	1.146 ± 0.0000	284	72, 199, 180, 167, 213
29	Carbamazepine	12.47 ± 0.019	1.176 ± 0.0015	236	193, 236, 192, 165, 139
30	Codeine	12.83 ± 0.000	1.210 ± 0.0000	299	299, 162, 124, 115, 70
31	Butacaine	13.13 ± 0.000	1.239 ± 0.0000	306	120, 142, 100, 178, 263
32	Diazepam	13.17 ± 0.000	1.242 ± 0.0000	284	256, 283, 284, 257, 255
33	Morphine	13.22 ± 0.006	1.247 ± 0.0005	285	285, 162, 115, 109, 215
34	Chlorprothixene	13.53 ± 0.008	1.276 ± 0.0008	315	58, 221, 255, 315
35	Chlorpromazine	13.53 ± 0.008	1.276 ± 0.0008	318	58, 86, 221, 318, 272
36	Codeine acetyl	13.67 ± 0.008	1.290 ± 0.0008	341	341, 282, 229, 115, 124
37	Chlordiazepoxide	13.70 ± 0.008	1.292 ± 0.0004	299	283, 282, 247, 124, 163
38	Thebaine	13.73 ± 0.006	1.295 ± 0.0005	311	311, 296, 140, 152, 115
39	6-Acetylmorphine	13.78 ± 0.004	1.300 ± 0.0004	327	268, 327, 165, 211, 242
40	Heroin	14.69 ± 0.011	1.386 ± 0.0011	369	327, 268, 369, 310, 204
41	Trifluoperazine	14.94 ± 0.011	1.409 ± 0.0011	407	70, 113, 141, 127, 248
42	Dibucaine	15.16 ± 0.010	1.430 ± 0.0010	343	86, 58, 116, 144, 228
43	Nitrazepam	16.26 ± 0.042	1.534 ± 0.0010	281	253, 280, 206, 234, 222
44	Papaverine	16.83 ± 0.006	1.588 ± 0.0041	339	338, 324, 339, 154, 308
45	Clozapine	17.41 ± 0.010	1.642 ± 0.0005	326	243, 256, 192, 227, 326
46	Estazolam	18.15 ± 0.026	1.712 ± 0.0026	294	205, 259, 239, 293, 294
47	Alprazolam	18.90 ± 0.026	1.783 ± 0.0026	308	77, 204, 279, 273, 308
48	Dihydroetorphine	20.91 ± 0.020	1.973 ± 0.0020	413	380, 395, 176, 115, 296

有相似结构的同类药物,往往有相同的特征离子。另外,某类药物的代谢物,往往有与药物原型相同的特征离子。参考有关文献^[3],并通过对几类药

物及其代谢物的特征离子进行综合分析比较,选出了此类药物及其代谢物的代表特征离子,见表2。

Tab 2 The representative ions of six category drugs and their metabolites for reconstructed chromatograms

Drug category	Representative characteristic ion
Barbiturates, methaqualone and their metabolites	141, 156, 167, 204, 235, 251, 219
Benzodiazepines and their metabolites*	283, 243, 268, 308, 253, 299, 251, 259
Tricyclic antidepressants, phenothiazines and their metabolites	58, 72, 193, 113, 179, 180, 215, 234
Local anaesthetics and their metabolites	82, 86, 100, 120, 140, 182, 58, 123
Analgesics and their metabolites	57, 71, 72, 162, 327, 324, 311, 277
Amphetamine stimulants and their metabolites	56, 58, 91, 135, 136, 137

* In view of the fact that clozapine and its metabolites have similar ions with the benzodiazepines, it is attributed to benzodiazepines

用所选代表特征离子的质量色谱图来筛选可能存在的药物及其代谢物,可以简化色谱图,排除一些杂质的干扰,同时节省时间,满足了毒物分析快速、准确的需要,这一点在实际中毒样品测定中得到证明。

2 血浆中 21 种毒物药物绝对回收率的测定

按前述方法处理样品后,用 GC-FID 对加入到血浆中的 21 种常见毒物药物进行了回收率测定,结果见表 3。

结果表明,在血浆药物浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 情况下,药物绝对回收率为 78% ~ 103%,相对标准偏差小于 7%。

由以上可见,所建系统化固相萃取方法通用性较好,对所选具有不同理化性质的药物均有较高的回收率。具有简单、快速,半自动化操作易于规范化,重现性好,提取干净和有机溶剂用量少等优点,能满足系统分析简单、快速、准确的要求。

3 应用

取中毒病人血浆 0.5 mL,按上述所建方法处理后,加内标正二十一烷 $2 \mu\text{g}$,乙酸乙酯 $100 \mu\text{L}$ 定容,用于 GC-MS 分析。利用质量色谱法结合谱库检索确认为安定、利眠宁和卡马西平及其代谢物,如图 2

所示。表 4 列出了 GC-MS 定性定量分析结果。

Tab 3 Absolute recoveries of 21 drugs in plasma at concentration of $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=5$)

Peak No. *	Drug	$20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		$5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
		Recoveries/ %	RSD/ %	Recoveries/ %	RSD/ %
1	Amobarbital	96.3	2.90	95.0	2.61
2	Pentobarbital	96.3	2.43	93.5	2.80
3	Pethidine	94.0	5.51	95.9	2.00
4	Secobarbital	96.1	2.01	94.5	2.03
5	Caffeine	93.1	6.75	93.9	4.18
6	Lidocaine	91.5	5.72	85.7	3.95
7	Phenobarbital	102.5	3.43	101.5	2.93
8	Methaqualone	95.2	1.40	90.2	2.33
9	Amitriptyline	93.2	1.54	89.3	4.31
10	Diazepam	96.5	3.15	87.9	2.70
11	Chlorpromazine	89.8	4.08	79.1	4.46
12	Methadone	92.1	2.12	91.0	2.25
13	Cocaine	93.5	1.68	86.9	4.47
14	Imipramine	93.7	2.62	89.6	3.23
15	Promethazine	91.4	3.93	96.9	3.39
16	Codeine	99.4	4.18	102.8	2.58
17	Codeine acetate	89.8	4.64	83.1	2.88
18	6-Acetyl morphine	98.8	6.98	101.8	2.63
19	Heroin	87.5	4.18	83.7	2.16
20	Clozapine	90.5	6.36	92.6	3.54
21	Dihydroetorphine	86.2	6.63	85.8	5.35

* Peak No. is arranged by the retention time of the drugs

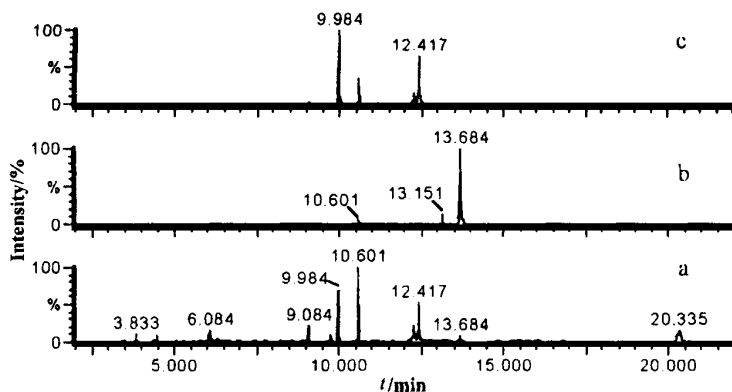


Fig 2 a. The total ion chromatogram of the patient plasma extract, RT 10.60 min (IS); b. Reconstructed mass chromatogram of selected ions for benzodiazepines (m/z 243 + 251 + 253 + 268 + 283 + 299 + 308), RT 13.15 min (diazepam), RT 13.68 min (chlordiazepoxide); c. Reconstructed mass chromatogram of selected ions for tricyclic antidepressants and phenothiazines (m/z 58 + 72 + 113 + 179 + 180 + 193 + 215 + 234), RT 12.42 min (carbamazepine), RT 9.98 min (carbamazepine metabolite)

Tab 4 The quantitative results of toxicants in plasma

Toxicant	Concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Diazepam	12.2
Chlordiazepoxide	14.9
Carbamazepine	115.1
Carbamazepine metabolite	

致谢: 本文得到杨进生教授、刘荫棠副研究员以及胡绪英老师的指导和帮助。

REFERENCES:

[1] Chen XH, Franke JP, Wijsbeek J, *et al.* Isolation of

acidic, neutral and basic drugs from whole blood using a single mixed mode solid phase extraction column [J]. *J Anal Toxicol*, 1992, **16**(6) :351 - 355.

[2] Chen XH, Wijsbeek J, Veen JV, *et al.* Solid phase extraction for the screening of acidic, neutral and basic drugs in plasma using a single column procedure on Bond Elut Certify [J]. *J Chromatogr*, 1990, **529**(1) :161 - 166.

[3] Pflieger K, Maurer HH, Weber A. Tables of measured compounds. Dyllick C. *Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites*. Part 1 Methods, Tables, Indexes. Second edition. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1992. 39 - 308.

COMPREHENSIVE SCREENING OF DRUGS AND TOXICANTS IN BIOLOGICAL SAMPLES USING SOLID PHASE EXTRACTION AND GC-MS

LI Li, ZHOU Yong Xin, LUO Yi

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

ABSTRACT: AIM To develop a method for systematic analysis of 47 toxicants and drugs in plasma.

METHODS A new versatile solid phase extraction/concentrator (SPEC) plus Multi-Modal disc was selected to extract the acidic, neutral and basic drugs by two different eluents, acidic ethyl acetate and basic ethyl acetate. The determinations were programmed by combining retention time, diagnostic ions and library search. Six to eight ions per category were individually selected from the mass spectra of the corresponding drugs and their metabolites. The screening was performed using reconstructed mass chromatograms of selected ions per category. **RESULTS** The absolute recoveries of 21 drugs from plasma exceeded 78% with relative standard deviations less than 7% at concentrations of $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The developed methods were applied to the detection of acute toxicants with good results. **CONCLUSION** These developed methods are simple, sensitive, rapid and reliable.

KEY WORDS: solid-phase extraction; SPEC Multi-Modal disc; GC-MS; systematic analysis; drugs and toxicants