

吸毒者尿样中 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡和可待因的 LC-MS/MS 分析

梁 晨, 叶海英, 张玉荣, 汪 蓉

(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: 建立吸毒者尿样中 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡、可待因的液相色谱-串联质谱分析方法。尿样经固相萃取后, 用 C_{18} 液相柱分离, 以含甲酸铵和甲酸的水、乙腈为流动相等度洗脱, 采用电喷雾电离 (ESI⁺), 多反应监测 (MRM) 模式检测目标化合物。以化合物的保留时间、2 对母离子/子离子对定性, 尿样中 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡的检测限为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡、可待因的检测限为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 线性关系良好, 相关系数 r 在 0.998 以上; 日内及日间精密密度均在 10% 以内。该方法快速、灵敏、简便、可靠, 能同时分析吸毒者尿样中的 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡和可待因。

关键词: 液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS); 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡; 吗啡; O^6 -单乙酰吗啡; 可待因; 固相萃取; 尿样

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2010)04-0224-04

Determination of Morphine-3- β -D-Glucuronide, Morphine, O^6 -Monoacetylmorphine and Codeine in Heroin Addicts' Urine by LC-MS/MS

LIANG Chen, YE Hai-ying, ZHANG Yu-rong, WANG Rong

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

Abstract: Morphine-3- β -D-glucuronide, morphine, codeine and O^6 -monoacetylmorphine in heroin addicts' urine samples were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrum (LC-MS/MS). The urine samples were extracted by solid phase extraction (SPE), isolated by the C_{18} column and then analyzed by MS. The positive electric spray ionization mode was applied, multiple reaction monitoring (MRM) mode was used to analyze target compounds. Identification was based on retention time and two pairs of precursor-to-product ion transitions. The limit of detection (LOD) is $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for morphine, codeine, O^6 -monoacetylmorphine and $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for morphine-3- β -D-glucuronide, the relative standard deviation of intra- and inter- day precision are less than 10%. The method shows high sensitivity and selectivity, and is suitable for the analysis of morphine-3- β -D-glucuronide, morphine, codeine, O^6 -monoacetylmorphine in heroin addicts' urine samples.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrum (LC-MS/MS); morphine-3- β -D-glucuronide; morphine; codeine; O^6 -monoacetylmorphine; solid phase extraction; urine

按照公安部《对吸食、注射毒品人员成瘾标准界定》的规定,凡查获吸食、注射毒品者,应进行毒瘾司法鉴定和吸毒违法行为的认定,这两个步骤的首位要素是对涉毒人员的尿液中毒品物质进行检测。为保证检测的客观性、准确性和及时性,必须了解海洛因在体内的代谢过程。海洛因在体内代谢快,几乎检测不到原体,很快代谢为吗啡和单乙酰吗啡,代谢产物吗啡与 β-D-葡萄糖醛酸发生结合反应。生物检材中吗啡类生物碱的分析已有很多报道,但是检材必须经过溶剂提取、衍生化等繁琐步骤,难以满足实际案件快速检验的需要^[1]。近年来,液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)技术发展迅速,它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,成为法医毒物分析强有力的工具。与 GC/MS 相比,LC-MS/MS 应用范围更广,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(MRM)模式通过 2 次离子选择作用,锁定目标物的母离子/子离子对,大大提高了分析的专一性和灵敏度。本工作建立的 LC-MS/MS 方法可同时分析吸毒者尿样中 3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、O⁶-单乙酰吗啡和可待因。

1 材料与方法

1.1 试剂

3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡、内标吗啡-d₃: 购自 Cerilliant 公司;吗啡、O⁶-单乙酰吗啡、可待因: 购自中国药品生物制品检定所。

乙腈、甲醇、甲酸、甲酸胺均为色谱纯;购自 Merck 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器及条件

1.2.1 仪器 Waters Alliance 2695/Quattro Premier XE 串联四极杆液相色谱-质谱联用仪;美国 Waters 公司产品,配有 MassLynxV4.1 软件。

1.2.2 色谱条件 Xterra MS C₁₈ 色谱柱(3.5 μm × 2.1 mm × 150 mm);流动相为 A(含 2 mmol · L⁻¹ 甲酸铵和 0.05% 甲酸的水): B(含 2 mmol · L⁻¹ 甲酸铵和 0.05% 甲酸的乙腈) = 90 : 10;柱温 45 °C;流速 0.2 mL · min⁻¹;进样量 10 μL。

1.2.3 质谱条件 多反应监测模式,电喷雾电压 3 200 V,雾化气(N₂)流速 600 L · h⁻¹,锥孔反吹气(N₂)流速 50 L · h⁻¹,离子源温度 105 °C,碰撞气为氩气。

1.2.4 MRM 参数 每个化合物选取 2 个子离子结合保留时间定性,选取峰强度较高的子离子进行定量分析,各参数列于表 1。

表 1 3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、O⁶-单乙酰吗啡、可待因及内标的质谱 MRM 参数

Table 1 Mass spectrometric parameters of morphine-3-β-D glucuronide, morphine, codeine, O⁶-monoacetylmorphine and morphine-d₃

药物名称	保留时间/min	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	锥孔电压/V	碰撞电压/eV
3-β-D-葡萄糖醛酸吗啡	2.00	462.2	286.2	50	30
			201.1		43
吗啡	2.25	286.1	165.1	50	38
			153.1		42
吗啡-d ₃	2.25	289.1	165.1	50	38
			153.1		42
可待因	3.60	300.2	215.2	45	28
			165.1		38
O ⁶ -单乙酰吗啡	4.70	328.2	211.2	50	25
			165.1		38

1.3 样品处理方法

依次用 1 mL 甲醇, 1 mL 水活化 Oasis HLB 柱(1 mL/30 mg), 精密吸取 1.0 mL 尿样, 加入 100 ng 内标, 混匀后上柱, 用 1 mL 含 5% 甲醇的水淋洗柱子, 然后用 1 mL 甲醇洗脱, 整个过程流速控制在 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 左右。洗脱液在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中空气流下吹干, 残渣用 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 初始流动相溶解, 转移至自动进样小瓶中, 进样。

2 结果与讨论

2.1 色谱行为

$3\text{-}\beta\text{-D}$ -葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡、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 1.98、2.25、3.58、4.70 和 2.26 min, 在 8 min 内完成分析, 色谱行为良好, 各化合物及内标的 MRM 色谱图示于图 1。

2.2 最低检测限

以峰强度较低的子离子峰强度信噪比 $S/N > 5$ 确定为最低检测限(LOD)。

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 1.0 mL 空白尿样, 配成系列浓度的样品, 按 1.3 操作。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, 各化合物线性关系良好, 线性方程列于表 2。高、中、低浓度日内重复测定 6 次得日内精密度, 连续测定 3 天得日间精密度, 列于表 3。

2.4 案例应用

本方法应用于一起实际案件的吸毒者尿样分析, 尿中检出 $3\text{-}\beta\text{-D}$ -葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡、可待因成分, 其含量分别为 2.603 、 0.044 、 0.331 、 $0.531 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

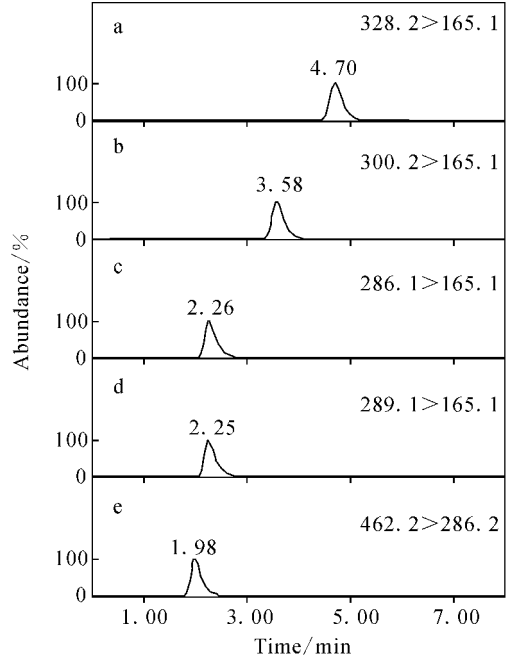


图 1 $3\text{-}\beta\text{-D}$ -葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡、可待因及内标的 MRM 色谱图
Fig. 1 MRM chromatograms of morphine- $3\text{-}\beta\text{-D}$ -glucuronide, morphine, O^6 -monoacetylmorphine, codeine and morphine- d_3

表 2 $3\text{-}\beta\text{-D}$ -葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、 O^6 -单乙酰吗啡、可待因的检测限和线性关系

Table 2 The limit of detection, linear equation and coefficient of morphine- $3\text{-}\beta\text{-D}$ -glucuronide, morphine, O^6 -monoacetylmorphine and codeine

药物名称	最低检测限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	线性范围/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	线性方程	相关系数
$3\text{-}\beta\text{-D}$ -葡萄糖醛酸吗啡	0.5	0.002~5	$y=0.669\ 98x-0.025\ 665$	0.999\ 521
吗啡	0.1	0.002~5	$y=7.606\ 13x+0.190\ 192$	0.999\ 490
可待因	0.1	0.002~5	$y=11.579\ 6x+0.531\ 457$	0.998\ 518
O^6 -单乙酰吗啡	0.1	0.002~5	$y=24.657\ 6x+1.755\ 89$	0.998\ 519

表 3 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、O⁶-单乙酰吗啡、可待因的日内及日间精密度Table 3 Intra- and inter-day precision of morphine-3- β -D-glucuronide, morphine, O⁶-monoacetylmorphine and codeine

药物名称	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	日内精密度 RSD/%(n=6)	日间精密度 RSD/%(n=3)
3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡	5	9.903	8.288
	50	5.524	4.811
	500	1.137	1.837
吗啡	5	1.656	3.290
	50	2.656	1.036
	500	0.938	1.664
可待因	5	2.452	2.093
	50	1.520	1.554
	500	0.659	2.469
O ⁶ -单乙酰吗啡	5	3.986	2.363
	50	3.500	2.282
	500	7.581	6.237

3 讨 论

在吸食或注射海洛因,特别是其导致死亡的案件中,毒品的定性定量检验是判断是否吸食此类毒品的直接依据。海洛因进入体内后,很快被血脂酶去乙酰化成 O⁶-单乙酰吗啡,再进一步代谢成去甲吗啡和吗啡。吗啡的主要代谢途径是 3 位羟基与葡萄糖醛酸结合,87% 的吗啡 72 h 内代谢掉,而其中 75% 为 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡形式^[2]。本工作建立的尿样中,3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、O⁶-单乙酰吗啡和可待因 4 种成分的分析方法,可用于判断可疑者是否吸食海洛因。

3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡是吗啡的主要代谢形式,由于水溶性强、极性大,提取、检测都比较困难,国内文献未见有关分析方法报道。常用的吗啡类生物碱提取溶剂 V(氯仿):V(异丙醇)=9:1 的提取效果不佳,通过比较,SPE 的效果比较满意。国外文献报道有吗啡类生物碱及其葡萄糖醛酸结合物的分析方法^[3-5],但 SPE 结合 LC-MS/MS 同时分析尿样中 3- β -D-葡萄糖醛酸吗啡、吗啡、O⁶-单乙酰吗啡和可待因的方法还未见报道。

参考文献:

- [1] 向平,沈敏,沈保华,等.生物检材中吗啡类生物碱的 LC-MS/MS 分析[J].法医学杂志,2006,22(1):52-54.
- [2] 吕海茹.尿中吗啡常见检测方法[J].刑事技术,2008,(2):29-31.
- [3] ARY K, RONA K. LC determination of morphine and morphine glucuronides in human plasma by coulometric and UV detection[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, 26(2): 179-187.
- [4] EDWARDS S R, SMITH M T. Simultaneous determination of morphine, oxycodone, morphine-3-glucuronide, and noroxycodone concentrations in rat serum by highperformance liquid chromatographic-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. Chromatogr, 2005, 814:241-249.
- [5] PROJEAN D, TU M, DUCHARME J. Rapid and simple method to determine morphine and its metabolites in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2003, 796(1): 95-103.