

·论 著·

甲基苯丙胺滥用与司来吉兰服用的区分:尿液中甲基苯丙胺和苯丙胺的手性分析

向平,卜俊,乔正,卓先义,吴何坚,沈敏

(司法鉴定科学研究院 上海市法医学重点实验室 上海市司法鉴定专业技术服务平台,上海 200063)

摘要:目的 考察司来吉兰及其代谢物在尿液中的含量变化,并结合实际案例探讨手性分析区分甲基苯丙胺滥用与司来吉兰服用的可行性。方法 采用 CHIROBIOTIC™ V2 手性液相色谱柱对尿液样品进行手性分离和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定,并对司来吉兰服药志愿者尿样、疑服用司来吉兰的涉毒人员尿样进行甲基苯丙胺和苯丙胺的手性分析。结果 服用 5mg 司来吉兰后,尿液中司来吉兰的检出时限仅为 7h。尿液中 R(-)-甲基苯丙胺和 R(-)-苯丙胺约在 7h 质量浓度最高,分别为 0.86 μg/mL 和 0.18 μg/mL,并在 80h 和 168h 后无法检出。应用该方法成功分析了疑服用司来吉兰的涉毒人员尿液中甲基苯丙胺和苯丙胺的来源。结论 甲基苯丙胺和苯丙胺的手性分析以及司来吉兰代谢物检测可区分甲基苯丙胺滥用与司来吉兰服用。

关键词:法医毒理学;甲基苯丙胺;苯丙胺;司来吉兰;手性分析;液相色谱-串联质谱;尿

中图分类号:DF795.1 文献标志码:A doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2017.06.006

文章编号:1004-5619(2017)06-0599-05

Identification of Methamphetamine Abuse and Selegiline Use: Chiral Analysis of Methamphetamine and Amphetamine in Urine

XIANG Ping, BU Jun, QIAO Zheng, ZHUO Xian-yi, WU He-jian, SHEN Min

(Shanghai Key Laboratory of Forensic Medicine, Shanghai Forensic Service Platform, Academy of Forensic Science, Shanghai 200063, China)

Abstract: Objective To study the content variation of selegiline and its metabolites in urine, and based on actual cases, to explore the feasibility for the identification of methamphetamine abuse and selegiline use by chiral analysis. **Methods** The urine samples were tested by chiral separation and LC-MS/MS method using CHIROBIOTIC™ V2 chiral liquid chromatography column. The chiral analysis of methamphetamine and amphetamine were performed on the urine samples from volunteers of selegiline use and drug addicts whom suspected taking selegiline. **Results** After 5 mg oral administration, the positive test time of selegiline in urine was less than 7 h. The mass concentrations of R(-)-methamphetamine and R(-)-amphetamine in urine peaked at 7 h which were 0.86 μg/mL and 0.18 μg/mL and couldn't be detected after 80 h and 168 h, respectively. The sources of methamphetamine and amphetamine in the urine from the drug addicts whom suspected taking selegiline were analysed successfully by present method. **Conclusion** The chiral analysis of methamphetamine and amphetamine, and the determination of selegiline's metabolites can be used to distinguish methamphetamine abuse from selegiline use.

Keywords: forensic toxicology; methamphetamine; amphetamine; selegiline; chiral analysis; LC-MS/MS; urine

甲基苯丙胺及其代谢物苯丙胺是强中枢神经兴奋剂,在全球范围内滥用日益严重。甲基苯丙胺和苯

丙胺均含有一个手性中心,他们的异构体存在不同的药理活性和药代动力学特征,S(+)-甲基苯丙胺的中枢神经兴奋作用比 R 构型强 5 倍^[1]。甲基苯丙胺主要经尿排泄,尿中甲基苯丙胺和代谢物苯丙胺含量高,并以游离形式存在。尿液是鉴定甲基苯丙胺滥用的首选检材^[2]。滥用毒品后,对尿液的检测可以快速地对结果进行判定。目前的实验室大多应用免疫方法进行初步筛选,呈阳性结果的再应用气相色谱-质谱(GC-MS)或液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法确认,但

基金项目:“十三五”国家重点研发计划资助项目(2016YFC0800704);上海市科委资助项目(15dz1207500);上海市法医学重点实验室资助项目(17DZ2273200);上海市司法鉴定专业技术服务平台资助项目(16DZ2290900)

作者简介:向平(1968—),女,博士,研究员,主要从事法医毒物学研究;E-mail:xiangp@ssfjd.cn

通信作者:沈敏,女,硕士,研究员,主要从事法医毒物学研究;E-mail:shenm@ssfjd.cn

这些方法并未对甲基苯丙胺和苯丙胺异构体进行手性拆分。

一些临床药物含有或者在体内代谢成甲基苯丙胺或苯丙胺^[3],如用于帕金森病治疗的处方药司来吉兰(selegiline)。司来吉兰口服后吸收迅速,体内代谢途径如图1所示,代谢物包括R(-)-甲基苯丙胺、R(-)-苯丙胺、去甲司来吉兰^[4]。目前在吸毒、毒驾鉴定实践中,常有尿检阳性的嫌疑人声称服用了司来吉兰。尿液中甲基苯丙胺和苯丙胺来源的区分问题,给法医毒物鉴定提出了新的挑战。有必要对甲基苯丙胺和苯丙胺进行手性拆分,以区分甲基苯丙胺滥用与司来吉兰服用^[3,5]。

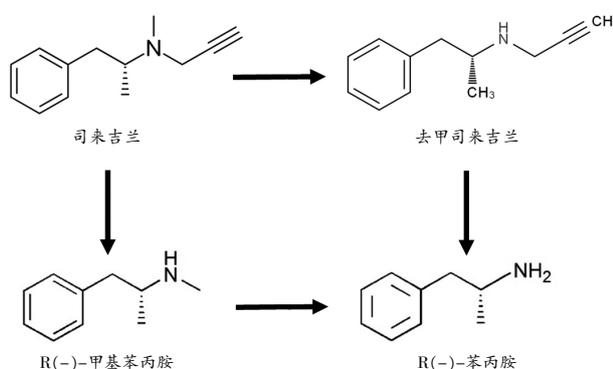


图1 司来吉兰体内代谢途径

尿液中甲基苯丙胺和苯丙胺异构体的手性分析可采用GC-MS法^[5-7],但是样品前处理通常需要液液提取或固相萃取后进行衍生化反应,费时繁琐且灵敏度低。本实验室拟通过尿液稀释法结合CHIROBIOTIC™ V2手性液相色谱柱建立S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺、R(-)-苯丙胺、司来吉兰及其代谢物去甲司来吉兰的LC-MS/MS测定方法^[8],并应用于司来吉兰服药实验和实际涉毒案例,

阐述尿液中甲基苯丙胺和苯丙胺手性分析的必要性和可行性。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

QTRAP® 6500 三重四极杆线性离子阱复合质谱系统(美国 AB SCIEX 公司),1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

外消旋甲基苯丙胺(1 mg/mL, 甲醇)、外消旋苯丙胺(1 mg/mL, 甲醇)、S(+)-甲基苯丙胺(1 mg/mL, 甲醇)、R(-)-甲基苯丙胺(1 mg/mL, 甲醇)、S(+)-苯丙胺(1 mg/mL, 甲醇)、R(-)-苯丙胺(1 mg/mL, 甲醇)、去甲司来吉兰(1 mg/mL, 甲醇)均购自美国 Cerilliant 公司;司来吉兰购自英国 Abcam 公司;内标 4-苯基丁胺购自中国药品生物制品检定所;甲醇(HPLC 级)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;冰醋酸、氨水(25%, 色谱纯)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;超纯水为实验室 Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)自制;其他化学试剂及药品均为分析纯。

1.2 仪器条件

色谱条件:色谱柱为 SUPELCO Astec CHIROBIOTIC™ V2 手性液相色谱柱(2.1 mm×250 mm, 5 μm),流动相为 V(甲醇):V(冰醋酸):V(氨水)=1 000:1:0.2,流速为 0.25 mL/min,进样量为 20 μL,进样器温度为 25 ℃,柱温为 25 ℃。

质谱条件:电喷雾离子源,采用正离子模式(ESI⁺),碰撞气 7 psi,气帘气 30 psi,离子喷射电压 5 500 V,离子源气 135 psi,离子源气 235 psi,离子源温度为 500 ℃,扫描方式为多反应监测。检测离子及其他相关参数见表 1。

表 1 7 种化合物的保留时间及质谱条件

化合物	保留时间(<i>t_R</i>)/min	前体离子(<i>m/z</i>)	碎片离子(<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
S(+)-甲基苯丙胺	10.7	150.1	91.1 ¹⁾	60	18
			119.1	60	5
R(-)-甲基苯丙胺	11.4	150.1	91.1 ¹⁾	60	18
			119.1	60	5
S(+)-苯丙胺	8.7	136.1	91.1 ¹⁾	50	15
			119.1	50	3
R(-)-苯丙胺	9.3	136.1	91.1 ¹⁾	50	15
			119.1	50	3
司来吉兰	4.5	188.0	91.0 ¹⁾	70	25
			119.0	70	20
去甲司来吉兰	6.0	174.0	91.0 ¹⁾	70	20
			119.0	70	15
内标 4-苯基丁胺	10.2	150.1	91.1 ¹⁾	60	15

注:1)为定量离子对

1.3 样品前处理

取尿液 100 μL , 置于 10 mL 玻璃管中, 加入内标 4-苯基丁胺溶液 (0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 10 μL , 加入 200 μL pH=9.2 硼砂缓冲液, 再加入 1.5 mL 乙醚, 涡旋混合 1 min, 以 867 \times g 离心 3 min, 取上清液, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中挥干。残余物中加入 200 μL 甲醇复溶, 取 5 μL 进样分析。

经方法验证^[8], S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺、R(-)-苯丙胺、司来吉兰、去甲司来吉兰 6 个目标物在 0.001~0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.05~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两个范围内线性关系良好, 所有标准曲线的决定系数 (R^2) 均大于 0.995, 最低检出限 (limit of detection, LOD)、最低定量限 (limit of quantitation, LOQ) 分别为 0.0005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。超过标准曲线最高定量限的实际阳性尿液可用甲醇稀释后测定。

1.4 样品收集

1.4.1 司来吉兰服药实验尿样

1 名健康志愿者, 无毒品滥用及精神活性物质用药史, 口服 1 片司来吉兰药片 (5 mg/片)。在服药前和服药后 0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、11、13、15、22、23、28、36、40、48、55、72、80、96、120、144、168、192 h 留取尿液, 分析前冷冻保存。本实验已通过司法鉴定科学研究院伦理委员会的伦理审查。

1.4.2 疑服用司来吉兰的涉毒案例尿样

2017 年 7 月一起交通事故中, 某司机驾驶吉普车与一辆面包车相撞, 造成面包车内 2 人死亡、2 人受伤。吉普车司机留取的尿液经当地实验室检测呈甲基苯丙胺阳性结果, 但司机称自己曾服用司来吉兰。为明确其尿液中甲基苯丙胺的来源, 故将尿液送至本实验室。

2 结果与讨论

2.1 司来吉兰服药实验尿样分析

尿液中司来吉兰及其代谢物去甲司来吉兰代谢快, 以代谢物 R(-)-甲基苯丙胺和 R(-)-苯丙胺为主, 药时曲线见图 2。司来吉兰服药后 3 h 收集的尿样按 1.3 节方法处理后进行手性分析, 结果见图 3。

服药后 1.5 h 尿液中可检出司来吉兰, 3 h 时质量浓度最高, 为 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 7 h 后无法检出司来吉兰原药。代谢物去甲司来吉兰在服药后 1 h 即出现, 2 h 时质量浓度最高, 为 0.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 55 h 后无法检出。而服药后 1.5 h R(-)-甲基苯丙胺和 R(-)-苯丙胺开始出现, 7 h 时浓度最高, 质量浓度分别为 0.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 然后缓慢下降。R(-)-苯丙胺和 R(-)-甲基苯丙胺的检测时限分别为 80 h 和 168 h。R(-)-甲

基苯丙胺浓度均高于 R(-)-苯丙胺, R(-)-苯丙胺与 R(-)-甲基苯丙胺比值范围为 0.13~0.46。

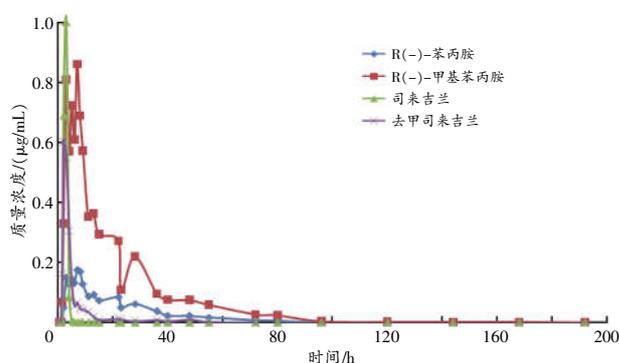


图 2 服药后尿液中司来吉兰及其代谢物的药时曲线

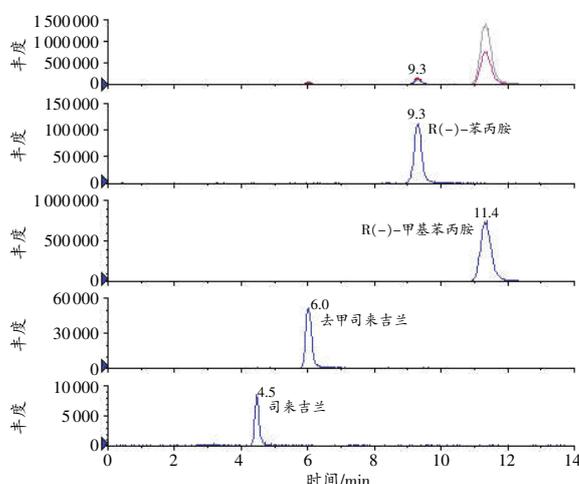


图 3 服用司来吉兰后 3 h 尿液中司来吉兰及其代谢物的 LC-MS/MS 图

本服药实验结果与文献^[9]报道一致, 司来吉兰在体内代谢和消除快, 大约服用剂量的 40% 在 48 h 内以代谢物形式排泄入尿。而代谢物 R(-)-甲基苯丙胺和 R(-)-苯丙胺在尿液中含量高, 检测时限长, 是区分甲基苯丙胺滥用与司来吉兰服用的主要标志物。

代谢物去甲司来吉兰排泄入尿少、含量低, 在以往的文獻^[10]中认为其难以作为服用司来吉兰的标志物。这些研究是在 20 世纪 90 年代, 当时主要采用 GC-MS 法, 最低检出限在 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 故低浓度的去甲司来吉兰无法检出。但目前采用 LC-MS/MS 法灵敏度可提高 200 倍, 本研究中服用 5 mg 司来吉兰, 去甲司来吉兰的检出时限约在 55 h。尤其自 2010 年开始出现含 R 构型的混合毒品以来, 含 R 构型的毒品数量以及 R 构型所占的比例逐年上升^[11]。因此, 将去甲司来吉兰纳入检测目标物可提供更多的信息以帮助解释尿液中 S(+)-甲基苯丙胺、R(-)-甲基苯丙胺、S(+)-苯丙胺和 R(-)-苯丙胺共存时的复杂案件。

2.2 吸毒者尿样分析

前期研究^[8]将收集到的 86 例甲基苯丙胺阳性尿

样进行手性分析测定。86个样品中,72个(83.7%)仅检测到S(+)-甲基苯丙胺和S(+)-苯丙胺,质量浓度范围分别为0.33~89.73 $\mu\text{g/mL}$ 和0.11~14.03 $\mu\text{g/mL}$,中位值分别为7.01和1.18 $\mu\text{g/mL}$ 。S(+)-苯丙胺与S(+)-甲基苯丙胺质量浓度比值范围为0.04~1.27,平均值为0.25,中位值为0.16。另外14个样品中同时检出S(+)-甲基苯丙胺和R(-)-甲基苯丙胺,但是仍以S构型为主,其中S(+)-甲基苯丙胺的质量浓度范围为0.33~69.87 $\mu\text{g/mL}$,R(-)-甲基苯丙胺的质量浓度范围为0.05~13.76 $\mu\text{g/mL}$,且在5个样品中检测到R(-)-甲基苯丙胺的质量浓度低于0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。14个样品中,R构型与S构型甲基苯丙胺质量浓度的比值范围为0.00~3.45,S(+)-苯丙胺的质量浓度范围为0.15~14.94 $\mu\text{g/mL}$,仅在4个样品中检测到R(-)-苯丙胺,除2个质量浓度低于0.05 $\mu\text{g/mL}$ 外,另2个质量浓度分别为0.06和0.29 $\mu\text{g/mL}$,苯丙胺的R构型与S构型质量浓度的比值分别为0.03和0.57。86例阳性尿样中未发现仅存在R(-)-甲基苯丙胺和R(-)-苯丙胺的现象,其中甲基苯丙胺的质量浓度均高于苯丙胺,表明滥用者服用的是甲基苯丙胺,而苯丙胺是甲基苯丙胺在人体内的代谢物。其中72个样品中仅检测出甲基苯丙胺和苯丙胺的S构型,表明S(+)-甲基苯丙胺是最常见的被吸毒者滥用的构型。

S(+)-甲基苯丙胺的生理学和和行为学作用均比R(-)-甲基苯丙胺强,已有数据表明目前毒品主要为该构型。有报道^[12]表明,查获的“冰毒”以及在黑市中非法走私的“冰毒”主要为S(+)-甲基苯丙胺。本课题组曾调查了上海、江苏和浙江三地142份“冰毒”和“麻古”,发现87.3%的甲基苯丙胺为S构型^[11]。张建新等^[13]调查了北京、天津、石家庄和成都地区的114份“冰毒”,发现S(+)-甲基苯丙胺占90.1%。尿液的检测结果和甲基苯丙胺对映异构体的流行性一致,表明通过对吸毒者尿液的检测,可以间接反映甲基苯丙胺滥用的流行性,并在对甲基苯丙胺前体化合物管制的法律制定方面提出参考信息。

2.3 疑服用司来吉兰的涉毒案例尿样分析

疑服用司来吉兰的涉毒案例尿样按1.3节方法处理后进行手性分析,结果见图4。尿液中仅检出S(+)-甲基苯丙胺和S(+)-苯丙胺,质量浓度分别为10.08 $\mu\text{g/mL}$ 和1.73 $\mu\text{g/mL}$;未检出R(-)-甲基苯丙胺和R(-)-苯丙胺。S(+)-苯丙胺与S(+)-甲基苯丙胺质量浓度比值为0.17,S(+)-甲基苯丙胺的质量浓度远高于S(+)-苯丙胺,表明该嫌疑人服用的是S(+)-甲基苯丙胺。本分析结果表明,该案当事人尿液中甲基苯丙胺和苯丙胺阳性结果源于吸食S(+)-甲基苯

丙胺毒品,而非源于司来吉兰。

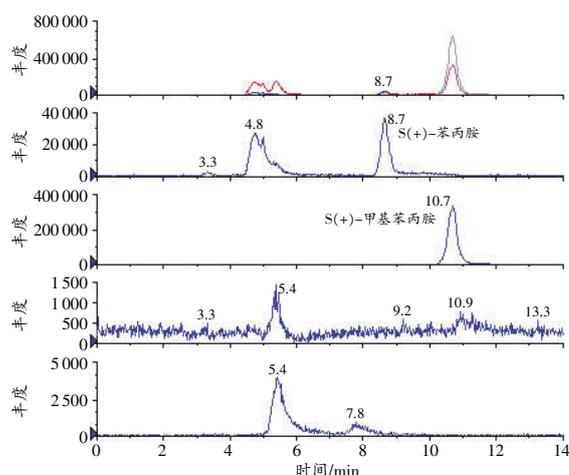


图4 实际案件尿液中S(+)-甲基苯丙胺和S(+)-苯丙胺的LC-MS/MS图

综上所述,本研究利用LC-MS/MS手性分析甲基苯丙胺和苯丙胺异构体,研究司来吉兰及其代谢物去甲司来吉兰、R(-)-甲基苯丙胺、R(-)-苯丙胺在尿液中的含量变化,具有简便快速、准确灵敏、取材量少等特点,可以应用于法医毒物鉴定的常规检测。服用5mg司来吉兰后,尿液中可检出司来吉兰、去甲司来吉兰和质量浓度相对较高的R(-)-甲基苯丙胺、R(-)-苯丙胺。疑服用司来吉兰的涉毒案例尿液中仅检出S(+)-甲基苯丙胺和S(+)-苯丙胺,表明其为滥用毒品甲基苯丙胺而非服用司来吉兰。甲基苯丙胺和苯丙胺的手性分析以及司来吉兰、去甲司来吉兰的检测可用于区分甲基苯丙胺滥用与司来吉兰服用。

参考文献:

- [1] 徐媛媛,庄华.论甲基苯丙胺的构型及其管制[J].中国药物滥用防治杂志,2010,16(1):22-25.
- [2] 沈敏,向平.滥用物质分析与应用[M].北京:科学出版社,2016.
- [3] MUSSHOF F. Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine[J]. Drug Metab Rev,2000,32(1):15-44.
- [4] SIU E C, TYNDALE R F. Selegiline is a mechanism-based inactivator of CYP2A6 inhibiting nicotine metabolism in humans and mice[J]. J Pharmacol Exp Ther,2008,324(3):992-999.
- [5] 张建新,张大明,韩旭光,等.从尿液中甲基苯丙胺对映体特征推断前体化学品[J].中国卫生检验杂志,2009(4):718-720.
- [6] RASMUSSEN L B, OLSEN K H, JOHANSEN S S. Chiral separation and quantification of R/S-amphetamine, R/S-methamphetamine, R/S-MDA, R/S-MDMA, and R/S-MDEA in whole blood by GC-EI-MS[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2006,

- 842(2):136-141.
- [7] 沈敏,沈保华,吴侔天,等. 人尿中 *D/L* 甲基苯丙胺和 *D/L* 苯丙胺的光学对映体分析及代谢研究[J]. 药物分析杂志,1998(1):21-25.
- [8] WANG T, SHEN B, SHI Y, et al. Chiral separation and determination of R/S-methamphetamine and its metabolite R/S-amphetamine in urine using LC-MS/MS[J]. Forensic Sci Int,2015,246:72-78.
- [9] HASEGAWA M, MATSUBARA K, FUKUSHIMA S, et al. Stereoselective analyses of selegiline metabolites: possible urinary markers for selegiline therapy[J]. Forensic Sci Int,1999,101(2):95-106.
- [10] MAURER H H, KRAEMER T. Toxicological detection of selegiline and its metabolites in urine using fluorescence polarization immunoassay (FPIA) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and differentiation by enantioselective GC-MS of the intake of selegiline from abuse of methamphetamine or amphetamine[J]. Arch Toxicol,1992,66(9):675-678.
- [11] WANG T, YU Z, SHI Y, et al. Enantiomer profiling of methamphetamine in white crystal and tablet forms (Ma old) using LC-MS-MS[J]. J Anal Toxicol,2015,39(7):551-556.
- [12] LEE J S, YANG W K, HAN E Y, et al. Monitoring precursor chemicals of methamphetamine through enantiomer profiling[J]. Forensic Sci Int,2007,173(1):68-72.
- [13] 张建新,张大明,张文芳,等. 从甲基苯丙胺的对映体特征推断前体化学品[J]. 卫生研究,2009,38(4):426-428.

(收稿日期:2017-08-13)

(本文编辑:严 慧)