

气相色谱-质谱联用快速筛查尿样中麻醉剂类药物

杨志勇, 王占良, 张建丽, 张亦农

(国家体育总局中国反兴奋剂中心, 北京 100029)

摘要:为了快速检测尿样中的麻醉剂类药物(可待因, 双氢可待因, 四氢大麻酚酸, 苯甲酰爱康宁, 6-乙酰吗啡, 吗啡, 羟考酮), 建立了气相色谱-质谱联用检测方法。尿样经葡萄糖醛酸酐酶酶解后, 采取 HLB Oasis 反相固相萃取柱纯化, 氮气吹干后衍生化, 采用 HP-5MS 柱(25 m×0.2 mm×0.33 μm)色谱分离, 程序升温, 质谱检测, SIM 方式采集。该方法的检测限为 5 mg/L, 在添加高、中、低 3 种浓度的相对回收率分布在 75%~123%, 满足常规检测要求, 样品前处理简单、快速、结果可靠。

关键词:气相色谱-质谱; 麻醉剂; 快速筛查; 尿样

中图分类号:O 657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2012)05-0161-07

Fast Screening Narcotic Agents in Human Urine by GC/MS

YANG Zhi-yong, WANG Zhan-liang, ZHANG Jian-li, ZHANG Yi-nong

(China Anti-Doping Agency, Beijing 100029, China)

Abstract: Seven narcotic agents (Codeine, Dihydrocodeine, Carboxy-THC, Benzoylcodeine, 6-acetylmorphine, Morphine, and Oxycodone) were simultaneously screened by gas chromatography-mass spectrometry coupling with electron impact ionization source. The urine sample was enzymatically hydrolysed and then purified by HLB Oasis solid prepared extraction column, the analytes after derivatization were completely separated by HP-5MS column (25 m×0.2 mm×0.33 μm thickness) in linear temperature program, methyltestosterone as internal standard. The relative recovery of analytes spiked in blank urine at high, middle and low level concentration ranged from 75% to 123%. The limit of detection for target analytes was 5 mg/L. The method is simple, rapid and reliable. It is suitable for routine analysis in human urine.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry(GC/MS); narcotic agents; fast screening; urine sample

麻醉剂类药物主要包含吗啡类药物、可卡因类药物和大麻, 被世界反兴奋剂机构(WADA)列入禁药名单^[1]。临床上吗啡类药物属阿片类生物碱, 为阿片受体激动剂, 激动中枢神经阿片受体而产生强大的镇痛作用, 主要经肝脏代谢, 在肝内与葡萄糖醛酸结合, 少量为游离型; 代谢

物主要包含可待因、吗啡、双氢可待因、6-乙酰吗啡、羟考酮等, 经肾脏排泄, 尿样中主要为结合型代谢物。可卡因别名古柯碱, 是人类发现的第一种具有局麻作用的天然生物碱, 主要经肝脏代谢为苯甲酰爱康宁, 在肝内与葡萄糖醛酸结合, 经肾脏排泄, 尿样中主要为结合型代谢物。大麻主

收稿日期: 2011-10-07; 修回日期: 2012-03-05

作者简介: 杨志勇(1971~), 男(汉族), 助理研究员, 主要从事兴奋剂检测技术研究。E-mail: dujion@163.com

要成分为四氢大麻酚、大麻二酚和大麻酚,主要经肝脏代谢为四氢大麻酚酸,在肝内与葡萄糖醛酸结合,经肾脏排泄,尿中主要为结合型代谢物,四氢大麻酚酸为 WADA 鉴别运动员是否服用大麻的唯一目标定量物质^[1]。

以上的 7 种尿样中麻醉剂常见代谢物质均为葡萄糖醛酸结合型代谢物,常规分析方法都需要酶解反应后,去除葡萄糖醛酸分析;该 7 种物质的酸碱性差异很大,可待因、吗啡、双氢可待因、6-乙酰吗啡和羟考酮为碱性,苯甲酰爱康宁和四氢大麻酚酸为酸性,液液提取需要酸、碱性分别提取,费时费力;提取溶剂也有差别,苯甲酰爱康宁需要使用特殊的混合溶剂($V(\text{氯仿})$:

$V(\text{异丙醇})=9:1$);而吗啡的液液提取回收率很差。固相萃取技术的出现解决以上的液液提取的不足,样品经酶解后直接经过 Oasis HLB 小柱纯化,样品回收率和检测限均显著提高。

目前,对此类药物的定性分析主要采用 GC/MS、LC/MS 方法^[2-20]。本实验基于 GC/MS 技术和固相萃取简单快速的样品前处理过程,建立一个快速准确检测尿样中的麻醉剂类药物代谢物的方法,旨在快速检测尿样中 7 个常见代谢物:可待因、吗啡、四氢大麻酚酸、双氢可待因、苯甲酰爱康宁、6-乙酰吗啡、羟考酮(其结构分别示于图 1)。

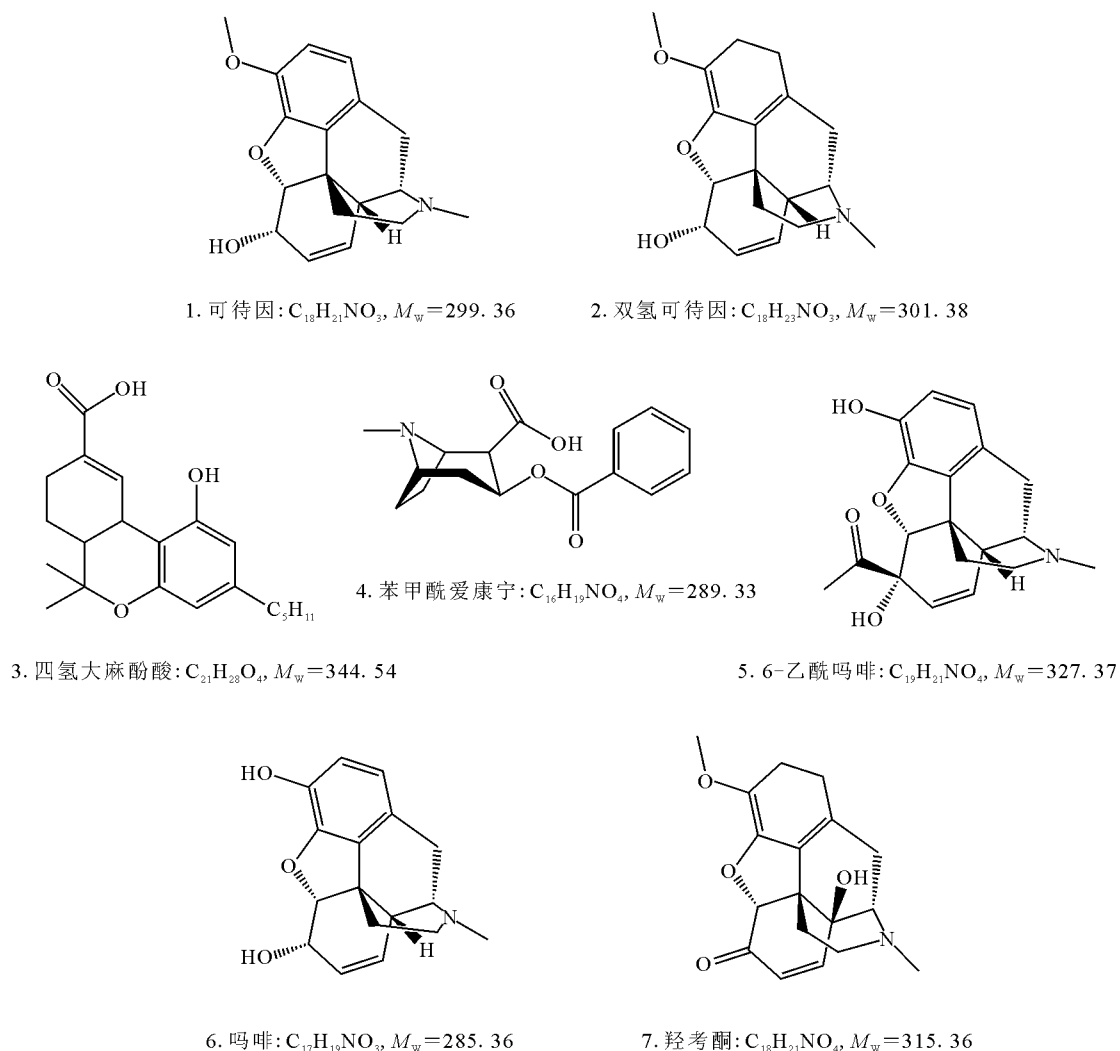


图 1 可待因、双氢可待因、四氢大麻酚酸、
苯甲酰爱康宁、6-乙酰吗啡、吗啡、羟考酮的
化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of Codeine, Dihydrocodeine, Carboxy-THC, Benzoylecgonine, 6-acetylmorphine, Morphine, and Oxycodone

1.1 仪器和试剂

7890GC-5975MS 气相色谱-质谱仪:美国 Agilent 公司产品;色谱柱 HP-5MS 柱:美国 Agilent 公司产品;低温恒温循环液浴两用槽:杭州雪中炭技术公司产品;Legend T 低速离心机:美国 Thermo 公司产品;Dri-block DB-3D 氮气吹干装置:美国 Techne 公司产品;沃特斯 20 孔固相萃取装置和 HLB Oasis 3cc 60 mg 反相固相萃取柱:美国 Waters 公司产品。

可待因、吗啡、双氢可待因、苯甲酰爱康宁、6-乙酰吗啡和羟考酮从澳大利亚购买,四氢大麻酚酸为实验室间赠送。分别精密称取配制成 1 g/L 的甲醇溶液(四氢大麻酚酸为 0.1 g/L); β -葡萄糖醛酸甙酶和甲基睾酮(内标,20 mg/L)购自 Sigma 公司;甲醇为色谱纯;磷酸氢二钾、磷酸二氢钾均为分析纯。0.1 mol/L 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾磷酸盐缓冲液 pH 6.9;三甲基硅基三氟乙酰胺:MSTFA,美国 Sigma 公司产品;三甲基碘硅烷:TMSI,美国 Sigma 公司产品;二

硫代赤糖醇:分析纯,美国 Sigma 公司产品,以 $V(\text{MSTFA}):V(\text{TMSI}):V(\text{二硫代赤糖醇})=1\,000:3:1$ 的溶剂为衍生化试剂。

1.2 样品前处理

尿样 2 mL, 20 μL 内标(甲基睾酮, 20 mg/L)甲醇溶液,加入 1 mL 磷酸缓冲液,50 μL β -葡萄糖醛酸甙酶(2 500 unit),55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中静置 120 min,取出样品冷却至室温,上样 HLB Oasis 3cc 60 mg 反相固相萃取柱(依次用 3 mL 甲醇,3 mL 水活化),3 mL 20% 甲醇水溶液淋洗后,采用 3 mL 甲醇洗脱,60 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹干,加入衍生化试剂 50 μL ,振荡 3 s 后转移入小瓶中,加盖,于 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,进样 2 μL ,进行 GC/MS 分析。

1.3 标准溶液的配制

分别准确量取 7 种药物的标准储备溶液配制成混合标准溶液,浓度列于表 1。取 10 μL 该溶液,空白尿样 2 mL,加入 20 μL 内标,按 1.2 步骤开始分析,结果示于图 2。

表 1 化合物 1~7 的质谱参数

Table 1 Mass parameters of compounds 1—7

编号	名称	浓度/(mg/L)	保留时间/(min)	m/z	m/z	m/z
1	可待因	400	13.085	371	178	196
2	双氢可待因	50	12.138	373	236	358
3	Δ^9 -四氢大麻酚酸	15	16.037	371	473	488
4	苯甲酰爱康宁	100	10.548	82	240	361
5	6-乙酰吗啡	50	14.511	399	340	287
6	吗啡	400	13.735	429	414	236
7	羟考酮	100	13.659	459	444	312
内标	甲基睾酮	N/A	16.340	301	446	431

1.4 仪器条件

色谱柱 HP-5MS 柱(25m \times 0.2 mm \times 0.33 μm);进样口温度:280 $^{\circ}\text{C}$;接口温度:300 $^{\circ}\text{C}$;采用恒压模式,柱压:75 kPa;分流比 10:1;进样 2 μL ;程序升温:180 $^{\circ}\text{C}$ 保持 0 min,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升到 220 $^{\circ}\text{C}$,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升到 260 $^{\circ}\text{C}$,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升到 300 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min;质谱离子源为 EI 源,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,源电压 70 eV;采集模式:SIM 方式。溶剂延迟时间 6 min。化合物的选择离子列于表 1。

1.5 方法灵敏度

量取 1.3 中的标准储备溶液稀释成 1 mg/L

的溶液,量取此溶液加入 2 mL 的空白尿样中,配制成含量为 2、5 和 10 mg/L 的标准添加尿样,采用 1.2 的样品处理方法,进样分析,按照 $S/N=3$ 的要求,计算检测限,检测限图示于图 3。

1.6 方法的重现性

高、中、低 3 种浓度的标准溶液中分别加入空白尿样 2 mL,每个浓度平行测定 6 份,按照 1.2 的前处理方法进行分析。内标校正后与平行处理的标准溶液添加的空白质控样品比对计算回收率,结果列于表 2。

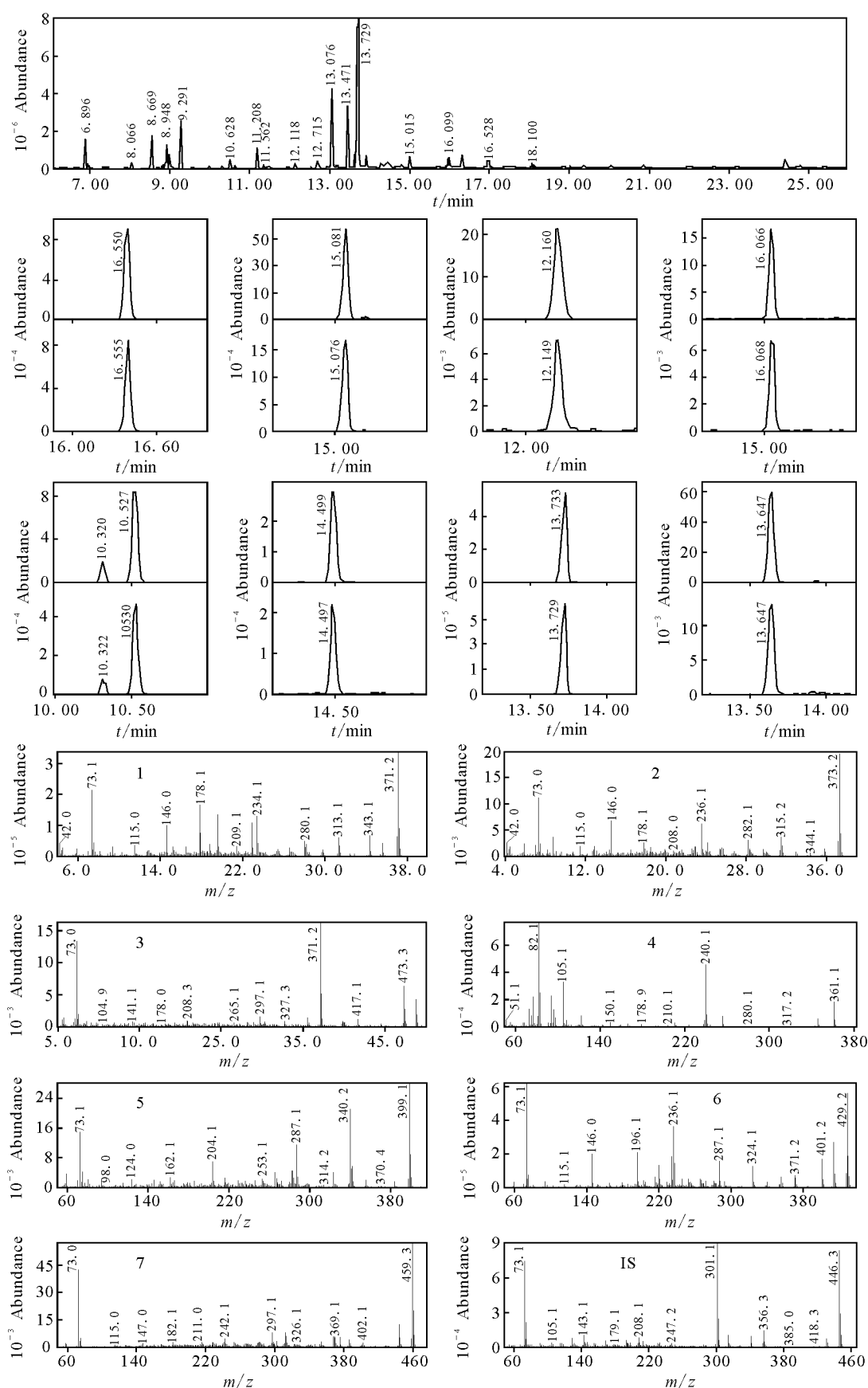


图 2 空白样本添加标准品后的选择离子图和化合物 1~7 的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of compounds 1—7 and spectra of blank urine spiked quality control solution

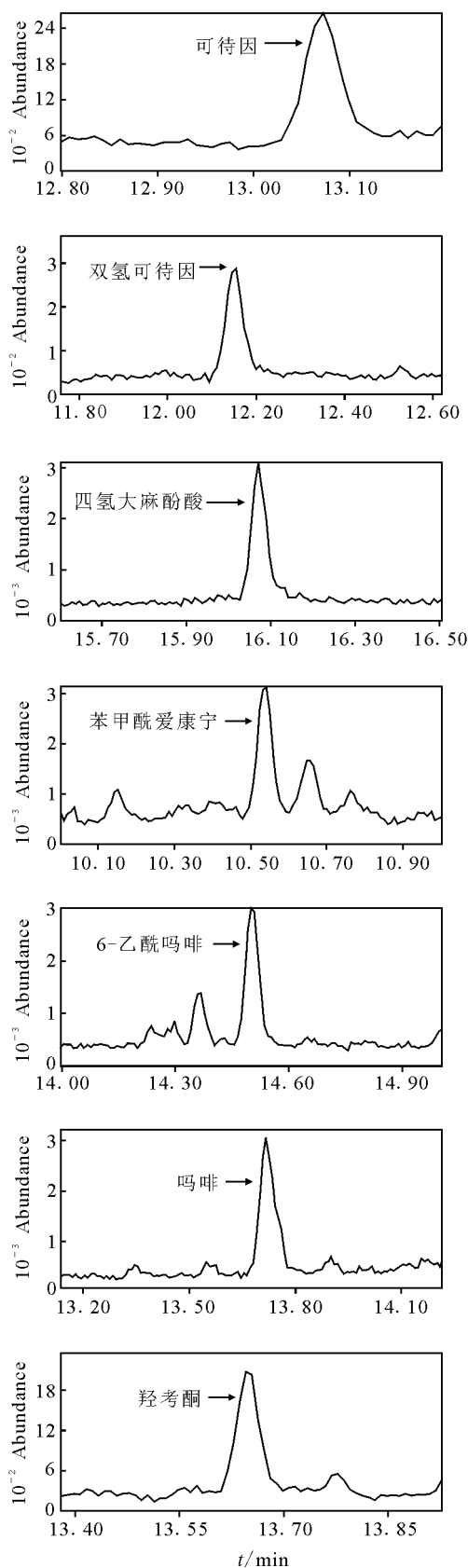


图3 7种常见代谢物的检测限图

Fig. 3 Detection limit spectrum of 7 kinds of narcotic agents

表2 化合物1~7的相对回收率

Table 2 The relative recovery of compounds 1—7

编号	名称	添加浓度/ (mg/L)	相对回收 率/% (n=6)
1	可待因	30	89~111
		100	93~106
		300	93~107
2	双氢可待因	30	89~111
		100	94~106
		300	94~106
3	Δ^9 -四氢大麻酚酸	30	90~105
		100	96~107
		300	92~109
4	苯甲酰爱康宁	30	76~117
		100	88~109
		300	82~113
5	6-乙酰吗啡	30	91~108
		100	92~107
		300	94~108
6	吗啡	30	91~113
		100	94~109
		300	95~109
7	羟考酮	30	77~114
		100	76~121
		300	75~123

2 结果与讨论

2.1 谱图

从图2的GC/MS选择离子图中可以看到,空白尿样中添加的7个标准物质与内标具有良好的分离度,各化合物的保留时间与内标位置适中,满足色谱分离的要求。化合物1~7的质谱结果中均含有衍生化反应的准分子离子峰,化合物1、2、4的准分子离子峰为单个TMS的分子离子,其余的则为2TMS的分子离子,衍生化反应主要发生在化合物的羟基、酮基和羰基。化合物1、2、5~7的化学结构很相似,具有相似的母核,质谱图中均具有 $[M-CH_3]^+$ 的碎片,而且强度比较一致,在10%左右,且具有相似的碎片离子 m/z 178、 m/z 196、 m/z 234 或 m/z 236等。化合物3的质谱图中含有 $[M-O=COT-MS]^+$ 碎片,即 m/z 371,同时也是基峰; m/z 473为 $[M-CH_3]^+$ 的碎片。化合物4的分子离子

峰为 m/z 361, 主要碎片 m/z 240 为连接两个环状结构的酯键断裂形成, 即 $[M - C_6H_5COO]^+$ 碎片。

2.2 检测限

化合物的检测限结果示于图 3, 从图 3 可以看出, 按照 $S/N=3$ 计算化合物 1~7 的检测限均为 5 mg/L, 以上结果满足了尿样检测的需要。

2.3 回收率和重现性

在高、中、低 3 种浓度的回收率实验中, 化合物 1~7 的回收率结果分布在 75%~123% 之间, 基本满足了定性检测要求。

2.4 应用举例

本方法已成功应用于能力验证《尿中常见毒物的测定》, 成功检出尿样中的可待因和吗啡, 其

选择离子流图示于图 4; 另外该方法作为实验室内标准方法用于检测社会送检的非运动员尿样。

2.5 讨论

固相萃取技术应用已经非常广泛, 其优势是解决了液体样本中难于液液提取或浓度很低不易富集等困扰, 一次将目标化合物全部提取, 简单而又省时, 提高了检测灵敏度和重现性; 但是目前还没有应用到兴奋剂尿样的常规检测中, 它还只是作为确证方法应用于可疑样品的确证分析。随着该方法的成熟和成本降低, 将固相萃取技术应用到兴奋剂尿样常规检测已是大势所趋。

对于大部分实验室, 气质联用仪器为基本配置, 因此, 结合固相萃取技术的本方法具有更广泛的适用性和实用性。

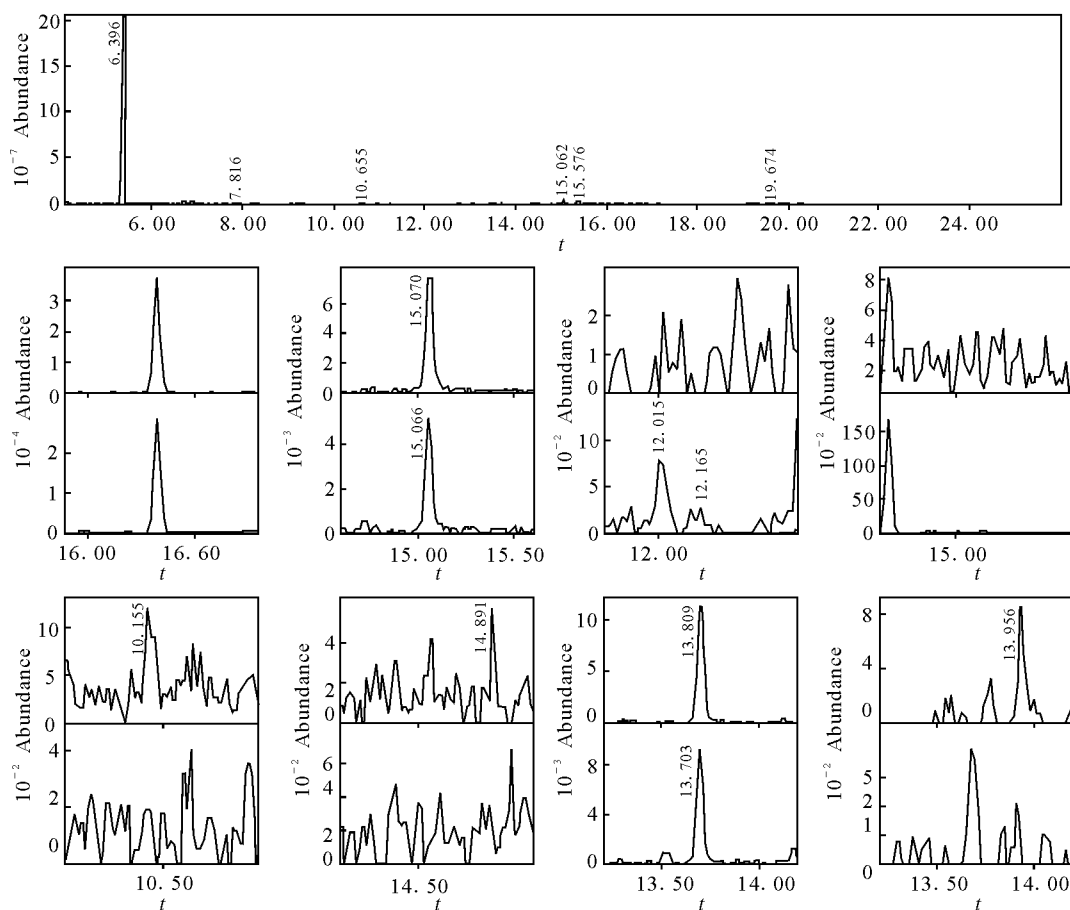


图 4 一例阳性样品的选择离子流图

Fig. 4 Multiple reaction monitoring spectra of a positive sample

参考文献:

- [1] WADA Prohibited list 2011[M]. World Anti-Doping Agency, 2011:1-10.
- [2] MARC L, NADJA G, MICHAEL S. Picomolar

concentrations of morphine in human urine determined by dansyl derivatization and liquid chromatography – mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2009, 879, 933-937.

- [3] UTE H, SONJA S, EBERHARD S, et al. Highly sensitive gas chromatographic – tandem mass spectrometric method for the determination of morphine and codeine in serum and urine in the femtomolar range[J]. *J Chromatogr B*, 1999, 727, 81-88.
- [4] TAKESHI S, HIROYASU M, SANNAE T et al. Rapid simultaneous determination of ephedrine, amphetamines, cocaine, cocaine metabolites, and opiates in human urine by GC/MS[J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2007, 43:358-363.
- [5] WOLFGANG W, MYLENE G, SUSANNE V, et al. Fast confirmation of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in urine by LC/MS/MS using negative atmospheric-pressure chemical ionisation (APCI)[J]. *Foren Sci Inter*, 2001, 121:103-107.
- [6] 梁晨, 叶海英, 张玉荣, 等. 柱切换 LC-MS/MS 分析吸毒尿样中的吗啡、O6-单乙酰吗啡、可待因、乙酰可待因[J]. *质谱学报*, 2011, 32(3): 159-163.
- [7] 梁晨, 叶海英, 张玉荣, 等. 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的 LC-MS/MS 分析[J]. *质谱学报*, 2010, 31(4): 224-227.
- [8] 崔凯荣, 吴筠, 王杉, 等. 尿中可待因及其代谢物的 GC/MS 及 SIM 测定[J]. *质谱学报*, 1994, 15(1):50-53.
- [9] 徐建中, 冯育, 何毅. 采用 GC-MS-NCI 方法检测毛发中大麻及其代谢物[J]. *质谱学报*, 2000, 21(Suppl):105.
- [10] MARIA M, CRISTIANA S, CLAUDIA V, et al. Simultaneous hair testing for opiates, cocaine, and metabolites by GC/MS: a survey of applicants for driving licenses with a history of drug use[J]. *Foren Sci Inter*, 2000, 107:157-167.
- [11] MARCHEI E, COLONE P, NASTASI G, et al. On-site screening and GC – MS analysis of cocaine and heroin metabolites in body-packers urine[J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2008, 48: 383-387.
- [12] PASCAL K, PATRICE M. Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) [J]. *Foren Sci Inter*, 1995, 73:93-100.
- [13] THOMAS B, ELSA L, ASBJORG S. Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC-MS/MS[J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 421-432.
- [14] HU Z Y, ZOU Q G, TIAN J X, et al. Simultaneous determination of codeine, ephedrine, guaifenesin and chlorpheniramine in beagle dog plasma using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection; Application to a bioequivalence study[J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879: 3 937-3 942.
- [15] ANITA B W, JITKA C, WOLFGANG T. Analysis of codeine, dihydrocodeine and their glucuronides in human urine by electrokinetic capillary immunoassays and capillary electrophoresis – ion trap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 895: 133-146.
- [16] MACIEJ J B, ROLF M, MANFRED E, et al. Determination of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine-glucuronide and 6-monoacetylmorphine in body fluids by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 1997, 703: 115-127.
- [17] CHRISTINE M, CYNTHIA C, KATHERINE C. Determination of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in human hair using solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection[J]. *J Chromatogr B*, 2007, 859: 208-212.
- [18] ALBERT D F, DAVID W. Urinary excretion profiles of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-hydroxy- Δ^9 -THC: cannabinoid metabolites to creatinine ratio study IV [J]. *Foren Sci Inter*, 2004, 143:147-152.
- [19] RICHARD A G, ERIC T M, ALLAN B, et al. Validated method for the simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry with positive chemical ionization[J]. *J Chromatogr B*, 2003, 798: 145-154.
- [20] ALBERT D. F, DAVID W. Urinary excretion profiles of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol: Study III. A Δ^9 -THC-COOH to creatinine ratio study[J]. *Foren Sci Inter*, 2003, 137: 196-202.