

三重四极杆质谱法快速检测人体尿液中的阿片类试剂

LCMSMS-086

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用快速测定人体尿液中阿片类试剂的分析方法。空白尿样经处理后，用超高效液相色谱分离，三重四极杆质谱仪进行定性分析。吗啡和单乙酰吗啡在 1.5 分钟内得到快速分离和检测。两种目标物具有良好的线性相关性，相关系数均为 0.9999。对 1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.13%~0.69% 和 0.78%~6.40% 之间，系统精密度良好。采取空白尿样基质加标低中高三个不同浓度的方法计算回收率进行方法验证，2 种目标物的方法回收率范围为 72.7%~123%，方法精密度 RSD% 在 1.66%~6.63% 之间，检出限在 91~130 ng/L 之间。

关键词：尿液 阿片类试剂 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

20 世纪 80 年代以来，海洛因的滥用已成为威胁人类健康和生命的严重社会问题，各国政府已采取了许多措施来打击吸、贩毒。尿液中海洛因代谢产物的检测是确认吸毒的科学依据。海洛因进入人体后迅速代谢为 6-单乙酰吗啡 (6-monoacetylmorphine, 6-MAM)，继而代谢为吗啡 (morphine, MOR)。少部分吗啡以游离形式随尿液排出，通常尿液组成复杂，干扰成分多，且待测物的含量往往较低，因此分析尿样基质中的毒品往往必须进行一定的样品前处理。常见的样品前处理有固相萃

取、固相微萃取、液液萃取等，这些样品前处理方法都可以不同程度的达到对目标物提纯、净化、浓

缩的作用，但是操作步骤较为繁琐、费时，成本高。因此发展准确、快速、高效的检测方法无论从禁毒或毒理研究等方面来说都有重要的意义。

本文采用简单样品前处理步骤，建立岛津超高效液相色谱与三重四极杆串联质谱联用法 (UHPLC-MS/MS) 快速分离、准确检测尿样中的吗啡和单乙酰吗啡。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色 谱 柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D. \times 50 mmL, 1.6 μm

流动相：A - 10 mM 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸)，B - 乙腈，A/B=90%/10% (V/V)

洗脱方式：等度洗脱

流速：0.4 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：400 $^{\circ}\text{C}$

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：50 ms

延迟时间：2 ms

MRM 参数：见表 1

表 1 MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q ₁ Pre Bias (V)	CE(V)	Q ₃ Pre Bias (V)
吗啡	286.1	165.00*	-19.0	-26.0	-21.0
	286.1	201.10	-19.0	-42.0	-30.0
单乙酰吗啡	328.1	165.05*	-30.0	-39.0	-30.0
	328.1	211.05	-30.0	-27.0	-14.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

将浓度各为 100 mg/L 的吗啡和单乙酰吗啡，用超纯水依次稀释至 1000 μg/L 的混合标样。

将 1000 μg/L 的 2 种毒品混合标样，用水逐级稀释成浓度为 0.5、1、2、5、10、20、50 或 100 μg/L 的标准工作液用于建立标准曲线。

1.3.2 样品前处理方法

采集正常人尿液贮存于 -18℃ 冰箱中，解冻后取上层清液过 0.22 μm 微孔滤膜 2 次，加标 2 种阿片类试剂混合标样，用超纯水稀释 10 倍后直接用于液质分析。空白基质分析采取尿样不加标的方式，其余处理步骤相同。

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子质谱扫描图

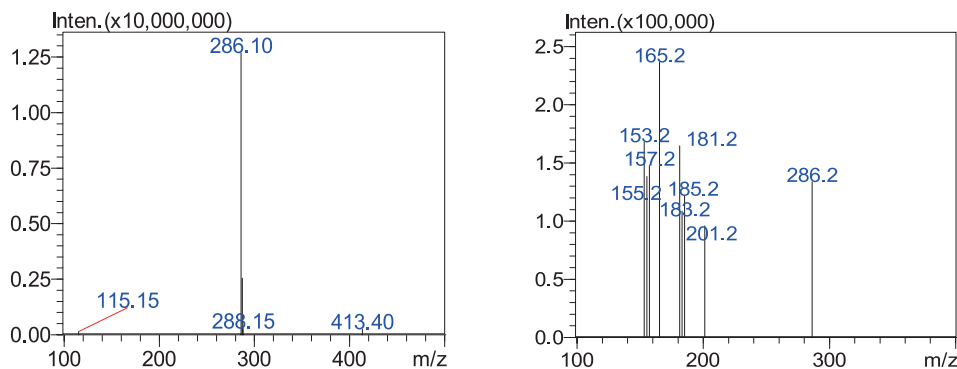


图 1 吗啡的一级质谱图（左图）和产物离子质谱扫描图（CE 值为-38V）（右图）

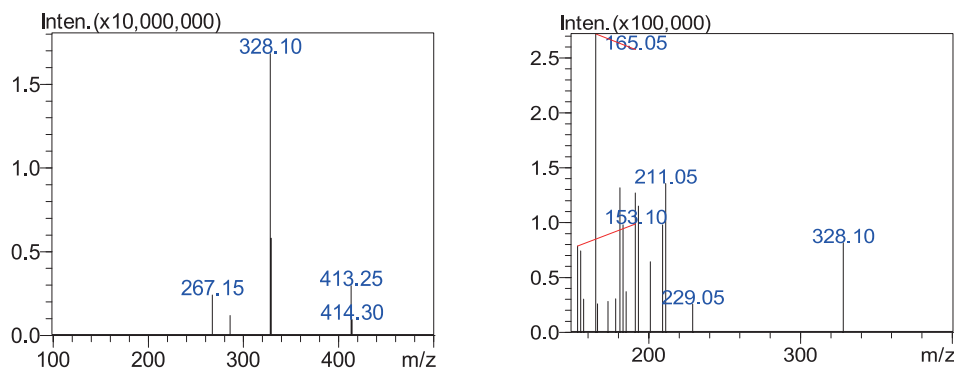


图 2 单乙酰吗啡的一级质谱图（左图）和产物离子质谱扫描图（CE 值为-38V）（右图）

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

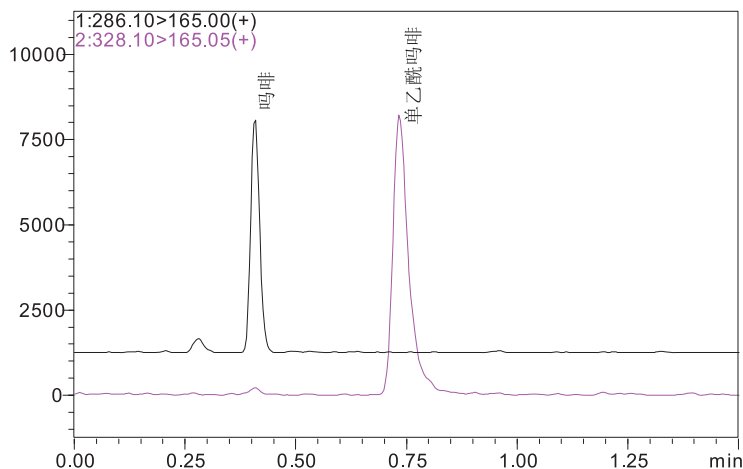


图3 吗啡 5 μ g/L 和单乙酰吗啡 10 μ g/L 的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

将标准工作液浓度为 0.5、1、2、5、10、20 和 50 μ g/L 的吗啡和标准工作液浓度为 1、2、5、10、20、50 和 100 μ g/L 的单乙酰吗啡按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法建立校准曲线，如图 5 所示。吗啡和单乙酰吗啡在各自的浓度范围内，线性相关性良好，相关系数均为 0.9999（见表 2）。

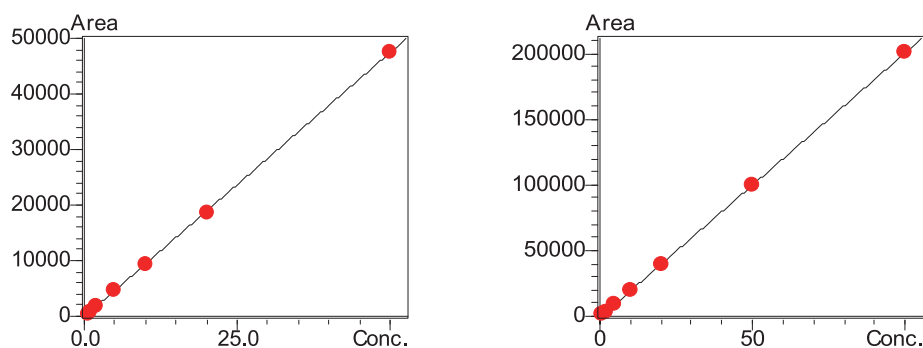


图4 吗啡（左图）和单乙酰吗啡（右图）的标准工作曲线

表2 吗啡和单乙酰吗啡的标准曲线

编号	名称	校准曲线	线性范围 (μ g/L)	相关系数 (R)
1	吗啡	$Y = (950.424)X + (-91.8708)$	0.5~50	0.9999
2	单乙酰吗啡	$Y = (2012.72)X + (-802.491)$	1.0~100	0.9999

2.4 检出限和定量限

为了考察仪器灵敏度，配制加标浓度为 1.0 μ g/L 的测试样品 7 份，平行进样 7 次。由 7 次进样测定的标准偏差 (S) 计算出检出限和定量限，此时检出限 $MDL = 3.14 \times S$ ，定量限 $LOQ = 4 \times MDL$ ，测定结果如表 3 所示。

表3 吗啡和单乙酰吗啡的检出限和定量限

编号	名称	浓度 (μ g/L)	标准偏差 (S)	检出限 (μ g/L)	定量限 (μ g/L)
1	吗啡	1.0	0.029	0.091	0.36
2	单乙酰吗啡	1.0	0.040	0.13	0.52

2.5 精密度实验

配制浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$ 的混合标样依次进样，平行测定 6 次，吗啡在不同浓度下的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.13%~0.35% 和 1.64%~5.97% 之间，单乙酰吗啡在不同浓度下的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.18%~0.69% 和 0.78%~6.40% 之间，仪器具有良好的精密度（见表 4）。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD%(1 $\mu\text{g/L}$)		RSD%(10 $\mu\text{g/L}$)		RSD%(50 $\mu\text{g/L}$)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
吗啡	0.35	5.97	0.13	3.14	0.18	1.64
单乙酰吗啡	0.69	6.40	0.18	2.84	0.40	0.78

2.6 基质加标实验

图 5 (A) 为空白尿样按照 1.3 中样品制备方法所得 MRM 色谱图，往空白尿样中添加 2 种阿片类试剂标样，使目标分析物的最终浓度均为 1、10、50 $\mu\text{g/L}$ ，平行实验测定 3 次，在不同浓度下吗啡的加标回收率范围为 72.7%~108%，RSD% 在 1.66%~6.63% 之间；单乙酰吗啡的加标回收率范围为 100%~123%，RSD% 在 2.26%~4.34% 之间（见表 5）。空白尿样基质加标浓度为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 的 MRM 色谱图如图 5 (B) 所示。

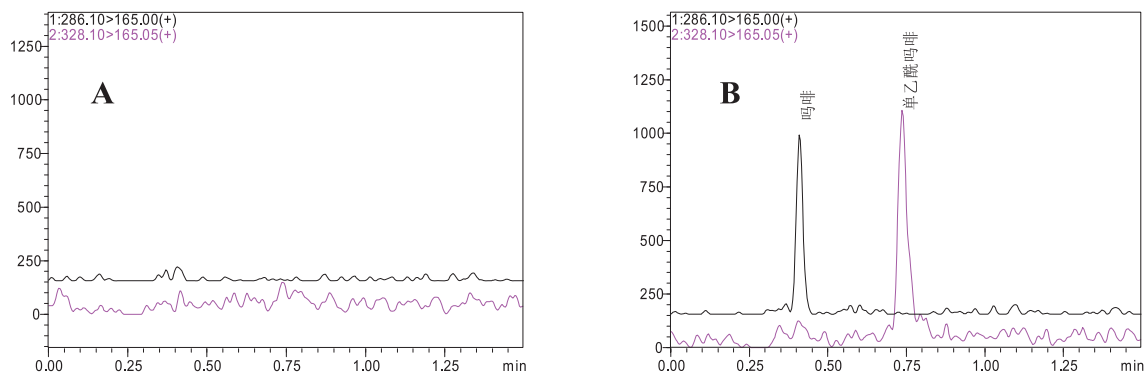


图 5 空白尿样 (A) 和尿样加标浓度为 1.0 $\mu\text{g/L}$ (B) 的 MRM 色谱图

表 5 尿样基质加标回收率(n=3)

化合物名称	1.0 $\mu\text{g/L}$		10 $\mu\text{g/L}$		50 $\mu\text{g/L}$	
	Recovery%	RSD%	Recovery%	RSD%	Recovery%	RSD%
吗啡	108%	6.63%	72.7%	4.41%	89.2%	1.66%
单乙酰吗啡	123%	4.34%	100%	3.25%	104%	2.26%

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用快速测定人体尿液中阿片类试剂的分析方法。吗啡和单乙酰吗啡分别在 0.5–50 $\mu\text{g/L}$ 、1.0–100 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内线性良好，相关系数均为 0.9999，方法检出限在 91–130 ng/L 之间，回收率范围为 72.7%~123%，方法精密度在 1.66%~6.63% 之间。分析结果灵敏度明显优于《司法鉴定技术规范》（SF/Z JD0107006–2010）中《生物检材中单乙酰吗啡、吗啡、可待因的测定—液相色谱—串联质谱法》对单乙酰吗啡和吗啡的测定要求。实验结果表明使用岛津超高效液相色谱 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用仪建立该分析方法具有简便、高效、快速、高灵敏度，可以满足法庭毒物分析的需求。