

CE检测海洛因依赖者尿吗啡的含量*

张亚海 周文华 张建兵 杨国栋(宁波 315010 宁波市微循环与萜类药研究所)

摘要 目的:采用高效毛细管电泳法(Capillary Electrophoresis, CE)检测海洛因依赖者尿吗啡的含量。方法:BECKMAN毛细管,内径 $50\mu\text{m}$,长度 67cm ;缓冲液:0.05 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠:乙腈(80:20), $\text{pH}=6.9$;缓冲液温度: $20\text{ }^\circ\text{C}$;紫外检测波长: 214nm ;衡压分离,分离电压: 15.00kV ;自动气压进样, 20psi , 5sec 。结果:在吗啡浓度为 $2\sim 1000\mu\text{g/ml}$ 范围内,线性良好,回归方程为 $Y=33.2928X+125.3384$, $r=0.999$, Y 为峰面积, X 为浓度($\mu\text{g/ml}$)。吗啡标准检测的日内相对标准偏差为 2.58% ,日间相对标准偏差为 4.41% ;加样回收率为 90.46% , RSD 为 7.18% 。采用此方法检测了5例海洛因依赖者脱毒前后的尿吗啡含量,脱毒前分别为 $34.35,46.82,60.81,25.72$ 和 $44.58\mu\text{g/ml}$,脱毒后期(末次吸毒后 150h)分别减少为 $0.44,0.52,1.32,0.15$ 和 $0.52\mu\text{g/ml}$ 。结论:此方法重现性好,灵敏度高,对海洛因依赖者的尿吗啡可进行定性、定量检测,可作为海洛因依赖者诊断和脱毒疗效评价的有效手段。

关键词 高效毛细管电泳;海洛因;依赖;脱毒;尿;吗啡

Determination of morphine concentration in heroin addicts urine by capillary electrophoresis(CE)

Zhang Yahai(Zhang YH), Zhou Wenhua(Zhou WH), Zhang Jianbing(Zhang JB), et al(Ningbo Institute of Microcirculation and Heroin, Ningbo 315010)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a quantitative method for the determination of morphine in heroin addicts urine by capillary electrophoresis (CE). **METHOD:** CE apparatus is consisted of BECKMAN capillary ($50\mu\text{m} \times 67\text{cm}$), an automated sampling and a UV-detector. The running buffer was $0.05\text{ mol/L Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ buffer:acetonitrile (80:20, v/v, $\text{pH} 6.9$) and the temperature was set at $20\text{ }^\circ\text{C}$. The detector wave-length was 214nm . Injection pressure was 20psi , 5sec and power supply was 15kV constant. **RESULTS:** The standard curve was linear in the range of morphine concentration from 2 to $1000\mu\text{g/ml}$, and the equation was $Y=33.2928X+125.3384$, [Y represents peak area, X represents morphine concentration($\mu\text{g/ml}$)], with the correlation coefficient of 0.999 . The average recovery of morphine was 90.46% , ($RSD=7.18\%$). The morphine concentrations in urine of five cases of heroin addict were determined by the method. The morphine concentrations were $34.35,46.82,60.81,25.72$ and $44.58\mu\text{g/ml}$ respectively at $3.5,2.5,4.5,8.0$ and 5.0 hours after last taking heroin and they were decreased to $0.44,0.52,1.32,0.15,0.52\mu\text{g/ml}$ at 150 hours after detoxification. **CONCLUSION:** The results showed that the method had excellent reproducibility and high sensitivity, which could be used to diagnose the morphine dependence and evaluate the detoxification efficiency.

KEY WORDS CE, heroin, addict, detoxification, urine, morphine

常用的毒品检测方法很多,如气相或/和气质联用法、薄层层析法、高效液相色谱法等。气质联用法是一种权威性的毒品确证方法,但其投资昂贵,对操作人员要求高;气相或/和气质联用法为提高检测灵敏度,往往需要对检测物进行衍生化,操作较繁琐;薄层层析法可对毒品进行快速的定性和粗定量检测,但不能精确定量;高效液相色谱法可对毒品进行定性和定量检测,但流动相耗费大,柱子平衡时间长。高效毛细管电泳

法(CE)是一系列以内径 $10\sim 200\mu\text{m}$ 的毛细管柱作为分离通道,对小分子和大分子进行高效率分离的有关技术之统称。采用CE技术进行阿片类毒品检测的文献报道国内外尚不多见。根据文献检索,国外已有应用CE检测药物制剂、头发、体液等中的阿片类药物含

*宁波市科委资助课题第9702011号

张亚海,男,32岁。1989年毕业于浙江医科大学药学系,主管药师

量的报道^[1-4],国内尚无类似报道。高效毛细管电泳检测方法的优势在于其微量进样和高分离率,采用浓缩方法,可提高样品的相对含量,从而提高检测的灵敏度。本文应用 CE 法检测了海洛因依赖者脱毒前后尿吗啡含量,同时与尿吗啡试剂板的检测结果进行比较。

1 仪器与试剂

高效毛细管电泳 (BECKMAN 公司, P/ACE SYSTEM 5000, 带自动进样系统和紫外检测器); BECKMAN 毛细管, 内径 50 μ m, 长度 67cm; 吗啡纯品 (青海制药厂, 批号 920521); pH 计 (BECKMAN 公司, Φ 100 型); 盐酸、氢氧化钾、硼酸钠、氯仿、异丙醇、无水硫酸钠、无水乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠均为分析纯; 水为反渗透膜制备的超纯水; 乙腈为色谱纯; 尿吗啡快速一步法制剂板 (美国 ABI 公司, 批号 960512, 检测灵敏度为 300ng/ml); 海洛因依赖者尿样 (本单位收治的海洛因依赖者, 合乎 DSM-III-R 中阿片依赖者诊断标准, 脱毒前尿样为病人入院时的尿样, 脱毒后期尿样为病人末次吸毒后 150h 的尿样, 经过尿吗啡试剂板检测, 其中 2 例为阴性, 2 例为阳性可疑, 1 例为阳性, 详见表 1)。

表 1 海洛因成瘾者脱毒前后尿吗啡浓度与吸毒量、吸毒时间的关系

姓名	性别	年龄	吸毒时间	吸毒量/ g/日	末次吸毒与 取样的时间 间隔/h	尿吗啡含量/ μ g \cdot ml $^{-1}$	
						脱毒前	脱毒后
徐某	男	21	1年(肌注3 月,静注1月)	0.1~0.3	3.5	34.35	0.4-
徐某	男	40	2年	0.7	2.5	46.82	0.52+
朱某	男	37	10月	1.5	4.5	60.81	1.32*
涂某	男	40	5月	0.5	8.0	25.72	0.15-
施某	女	24	2年	0.25	5.0	44.58	0.52+

注: - - 代表尿吗啡试剂板快速一步法检测阴性; + - 代表尿吗啡试剂板快速一步法检测阳性可疑; * - 代表尿吗啡试剂板快速一步法检测阳性

2 实验与结果

2.1 电泳条件

BECKMAN 毛细管, 内径 50 μ m, 长度 67cm; 缓冲液: 0.05 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠: 乙腈 (80:20), pH=6.9; 缓冲液温度: 20 $^{\circ}$ C; 紫外检测波长: 214nm; 平衡分离, 分离电压: 15.00kV; 自动气压进样, 20pis, 5sec。吗啡标准的电泳图见图 1。

2.2 标准曲线制备

精密称吗啡标准品, 加入无水乙醇 1: 缓冲液 1 [0.05 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠: 乙腈 (80:20), pH

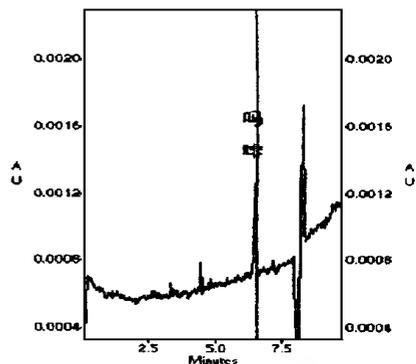


图 1 吗啡标准(100 μ g/ml)的电泳图谱

= 6.9]溶解^[5], 配制成浓度分别为 2, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250, 500 和 1000 μ g/ml 的吗啡标准溶液。依上述电泳条件进行检测, 分别求得峰面积。用吗啡浓度与相应的峰面积求得回归方程。实验结果表明, 吗啡系列标准溶液与相应的峰面积在 2~1000 μ g/ml 范围内, 有良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 33.2928X + 125.3384$, $r = 0.999$, Y 为峰面积, X 为浓度 (μ g/ml)。

2.3 精密度试验

吗啡标准检测的日内相对标准偏差为 2.58%, 日间相对标准偏差为 4.41%。

2.4 尿吗啡提取法

根据卫生部推荐的“阿片类药物滥用者尿液检查指导原则”, 按照本实验的要求改进后, 进行尿吗啡的提取^[6]。取尿样 5ml (尿吗啡浓度较低情况下, 可适当增加尿样量), 加入浓盐酸 0.5ml, 在高压消毒锅中 (15pis) 加热, 水解半小时, 过滤, 加氢氧化钾-硼酸钠缓冲液 (氢氧化钾 114g 溶于 100ml 水中, 所成的溶液和硼酸钠饱和水溶液 1:3 混合) 约 2ml, 调 pH 至 9, 用 15ml 的乙醚用力振摇提取一次, 静置分层^[7]。取水层, 用 15ml 氯仿-异丙醇 (3:1) 混合溶媒用力振摇提取一次, 静置分层, 有机层用 5ml 水洗涤一次俟分层, 有机层通过无水硫酸钠过滤, 蒸去溶媒, 加入适量 (25~200 μ l) 的无水乙醇溶解, 再加入相同体积适量 (25~200 μ l) 的缓冲液, 溶解, 进行检测。

2.5 吗啡加样回收率试验

吗啡加样回收率为 90.46%, RDS 为 7.18%, 尿吗啡的电泳图见图 2。

2.6 海洛因依赖者尿吗啡的含量检测

分别精密移取海洛因依赖者尿液 5ml (尿吗啡浓度较低情况下, 可适当增加尿样量), 依上述尿吗啡提取法提取尿吗啡, 然后依上述电泳法进行检测, 分别求得峰面积。根据回归方程求得浓度, 计算尿吗啡的含量。实验结果表明, 海洛因依赖者脱毒前的尿吗啡浓度分

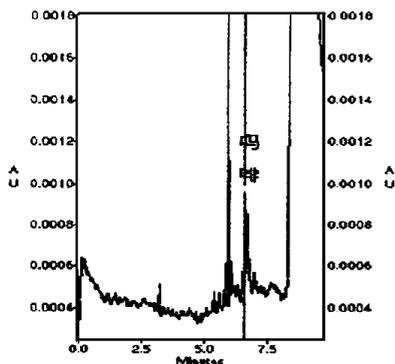


图2 正常人尿液加入吗啡标准(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$),酸解,提取物(吗啡终浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的电泳图谱
别为34.35,46.82,60.81,25.72,和44.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$,脱毒后期(末次吸毒后150h)的尿吗啡浓度分别减少为0.44,0.52,1.32,0.15和0.52 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。海洛因依赖者脱毒前后尿吗啡浓度与吸毒量、吸毒时间、末次吸毒与取样的时间间隔的关系以及脱毒后期(末次吸毒后150h)尿吗啡浓度与尿吗啡试剂板检测结果的关系见表1,治疗前后的尿吗啡电泳图见图3、4。

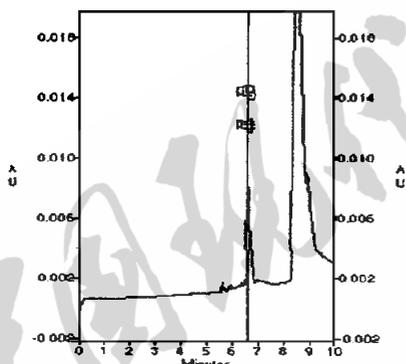


图3 海洛因成瘾者治疗前尿吗啡电泳图谱

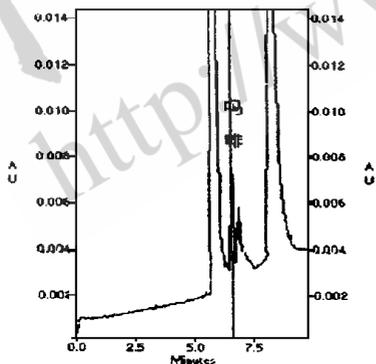


图4 海洛因成瘾者治疗后期(脱毒150h)尿吗啡电泳图谱

3 讨论

海洛因在人体内分解迅速,首先成为单乙酰吗啡,然后代谢成吗啡。海洛因依赖者尿中吗啡主要以葡萄

糖醛酸结合状态存在。常用的检测方法(如气相或气质联用法、薄层层析法、高效液相色谱法等)检测的都是游离吗啡^[7],所以尿中的葡萄糖醛酸结合吗啡一般先经过水解,使吗啡游离,然后进行检测。水解可采用高温酸解或用葡萄糖醛酸酶进行酶解。在尿吗啡提取过程中,加入乙醚进行提取的目的是为了去除本实验海洛因依赖者治疗前后尿样中可能含有的安定类药物^[7]。

实验结果发现,海洛因依赖者脱毒前尿吗啡含量与吸毒量、吸毒时间、末次吸毒与取样的时间间隔有一定的关系,可能还受到所吸毒品的纯度(即所吸毒品的绝对量)、吸毒方式、尿容量及病人主诉的可信度等因素的影响。海洛因依赖者脱毒后期(末次吸毒后150h)经过尿吗啡试剂板检测,2例为阴性,2例为阳性可疑,1例为阳性,说明大多数病人经过6d的治疗其尿吗啡水平已接近于国际上海洛因依赖者脱毒成功尿吗啡含量低于300ng/ml的标准^[8]。5例病人中有1例脱毒后期(末次吸毒后150h)尿吗啡试剂板检测为阳性,可能与吸毒量大、所吸毒品纯度高有关,与病人的主诉一致。5例病人脱毒后期(末次吸毒后150h)尿吗啡含量通过CE法检测分别为0.44,0.52,1.32,0.15和0.52 $\mu\text{g}/\text{ml}$,与尿吗啡试剂板的检测结果有对应关系。若把尿吗啡试剂板检测阴性的尿样经高温酸解后,调pH=7.0,再用尿吗啡试剂板进行检测,可为阳性,说明试剂板对葡萄糖醛酸结合的吗啡和游离吗啡反应性是有差异的。

由于海洛因依赖者在脱毒后期尿吗啡含量较低,必须选用灵敏度较高的检测方法才能进行准确的定量。毛细管电泳仪器投资中等,耗材量极少,本文利用其微量进样和高分离率特点,对尿吗啡进行准确的定量,是一种较理想的方法。CE法具有较好的重现性,其灵敏度可满足海洛因依赖者脱毒后尿吗啡测定的要求。因此,CE法测定尿吗啡不仅可作为定量的方法,而且可作为海洛因依赖者诊断及评价脱毒效果的指标。

参考文献

- 1 Tagliaro F, Poiesi C, *et al*. Capillary electrophoresis for the investigation of illicit drugs in hair: determination of cocaine and morphine. *J Chromatogr*, 1993 May 28, 638(2): 303.
- 2 Bjornsdottir I, Hansen SH. Determination of opium alkaloids in crude opium using non-aqueous capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*, 1995, 13(12): 1473.
- 3 Hyotylainen T, Siren H, *et al*. Determination of morphine

- analogues, caffeine and amphetamine in biological fluids by capillary electrophoresis with the marker technique. *J Chromatogr*, 1996 May 31, 735(1 - 2): 439.
- 4 Wernly P, Thormann W, Bourquin D, *et al*. Determination of morphine 3-glucuronide in human urine by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary. *J Chromatogr*, 1993 Jul 2; 616(2): 305.
- 5 United Nations. Recommended Methods for Testing Heroin. New York, 1986: 4.
- 6 中华人民共和国卫生部药政管理局编著. 阿片类成瘾常用戒毒疗法的指导原则. 1993: 21.
- 7 姜佐宁, 万文鹏等主编. 药物滥用(临床·治疗·检测·管理). 北京: 科学出版社, 1992: 263.

收稿日期: 1998 - 12 - 25