

·技术与应用·

GC-MS 法测定血中 1-甲基海因含量及其法医学应用

高利娜,袁慧雅,徐恩宇,刘俊亭

(中国医科大学法医学院,辽宁 沈阳 110013)

摘要:目的 建立全血中 1-甲基海因的气相色谱-质谱(GC-MS)分析方法,为 1-甲基海因相关法医学鉴定案件提供技术支持。**方法** 取 0.5 mL 血样,加入 500 ng 内标盐酸双苯戊二氨酯(SKF_{525A})、0.01 mol/L 稀盐酸溶液 2 mL,加入碳酸铵 0.5 g 调节 pH 值为 9,加入乙酸乙酯 2 mL,然后离心,取有机溶剂层,吹干后进行 GC-MS 分析。**结果** 血液中 1-甲基海因在 0.5~50 ng/mL 范围内线性关系良好,线性回归方程为 $y=0.01551x+0.00726$ ($R^2=0.9997$),最低检出限为 0.1 ng/mL,回收率为 93.02%~108.12%,日内、日间精密度分别小于 6.07% 和 13.37%。**结论** 本方法测定所得结果准确,重现性好,可用于血样中 1-甲基海因含量的测定。

关键词: 法医毒理学;气相色谱-质谱法;血液;1-甲基海因;代谢物

中图分类号: DF795.1 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2017.06.011

文章编号: 1004-5619(2017)06-0619-03

Determination of 1-methylhydantoin Concentration in Blood by GC-MS Method and Its Application in Forensic Medicine

GAO Li-na, YUAN Hui-ya, XU En-yu, LIU Jun-ting

(School of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang 110013, China)

Abstract: **Objective** To establish a gas chromatographic-mass spectrometric (GC-MS) analysis method for quantifying 1-methylhydantoin concentration in whole blood. To provide technical support to forensic identification related cases of 1-methylhydantoin. **Methods** As an internal standard, 500 ng SKF_{525A} was added to 0.5 mL blood sample, and then 2 mL 0.01 mol/L dilute hydrochloric acid and 0.5 g ammonium carbonate were added in order to buffer the pH value to 9, and following 2 mL ethyl acetate. The organic solvent layer was obtained after centrifuge and then analysed by GC-MS after drying. **Results** Good linear relationship of 1-methylhydantoin in blood was obtained in the range of 0.5–50 ng/mL. The equation of linear regression was $y=0.01551x+0.00726$ ($R^2=0.9997$) with 0.1 ng/mL detection limit, and the recovery was 93.02%–108.12%. The intra-day and inter-day precision were less than 6.07% and 13.37%, respectively. **Conclusion** The results gotten by this method is accurate and reproducible, which can be used for the determination of 1-methylhydantoin concentration in blood samples.

Keywords: forensic toxicology; gas chromatography-mass spectrometry; blood; 1-methylhydantoin; metabolite

死后生物化学检查是法医学鉴定中重要的检查手段^[1-4]。肌酐是临床上常用的生化学检测指标,也是反映代谢紊乱和肾功能的主要指标,对法医学应用具有一定的指导意义。而肌酐的中间代谢产物 1-甲基海因(1-methylhydantoin, 1-MH)是新近发现的尿毒症毒素,其化学结构见图 1。有研究^[5-8]表明,尿毒症患者血中 1-甲基海因明显高于正常人,且 1-甲基海因

为细菌分解肌酐后的产物,可结合肌酐、尿素氮含量评价肾功能,故其也可作为生化学检测物质应用于法医学鉴定。有报道^[9]采用高效液相色谱(HPLC)法对蛤蟆油中 1-甲基海因进行测定,而血中 1-甲基海因含量测定少有报道。本研究拟采用气相色谱-质谱(GC-MS)法测定血中 1-甲基海因含量,以期对相关领域工作提供参考。

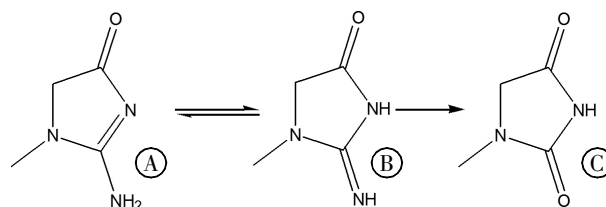


图 1 肌酐(A、B)及 1-甲基海因(C)化学结构

基金项目:辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2015570)

作者简介:高利娜(1983—),女,博士,副教授,主要从事体内药毒物分析研究;E-mail:gaolina0114@sina.com

通信作者:刘俊亭,男,教授,博士研究生导师,主要从事体内药毒物分析研究;E-mail:liujunting8@163.com

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

7890B-5977A 气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司)。

1-甲基海因标准品购自上海一研生物科技有限公司,纯度>99.5%。盐酸双苯戊二氨酯(SKF_{525A})标准品购自美国 Sigma-Aldrich 公司,纯度>95%。甲醇为色谱纯,环己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷均为分析纯。

1.2 溶液配制

1-甲基海因标准液:精密称取 10 mg 1-甲基海因标准品,用蒸馏水配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液。然后用蒸馏水逐级稀释为 50、10、5、1、0.5 ng/mL 的 1-甲基海因标准溶液。

内标 SKF_{525A} 溶液:准确称取 SKF_{525A} 标准品 10 mg 置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,混匀,得 1 mg/mL 的内标溶液,然后用甲醇稀释为 100 μg/mL 的工作液。

1.3 方法

1.3.1 仪器条件

选用 Rtx-5 色谱柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm),初始柱温 60℃,保持 1 min,以 20℃/min 升温至 260℃,保持 11 min,总分析时间为 22 min。进样口温度 265℃,接口温度 260℃,离子源温度 230℃。扫描范围 m/z 35~450。载气为氦气,流速 1.0 mL/min,采用电子轰击式离子源。

1.3.2 样品前处理

取待测血液 0.5 mL,加入 5 μL 内标、2 mL 0.01 mol/L 稀盐酸溶液,振荡 2 min,再加入碳酸铵 0.5 g 调节 pH 值为 9。加入 2 mL 乙酸乙酯,振荡 2 min,之后以离心半径 5 cm,4 000 r/min,离心 10 min。吸取上层有机溶剂,用氮气吹干至 100 μL。取 1 μL 用于 GC-MS 进样。

1.3.3 工作曲线、最低检出限、线性范围

按 1.3.2 节操作,每份样品平行测定 3 次,以 1-甲基海因的质量浓度为自变量(x),1-甲基海因与内标峰面积的比值为因变量(y),绘制标准曲线。以信噪比的 2 倍为最低检出限,以信噪比的 10 倍为最低定量限^[10]。

1.3.4 精密度和回收率

取添加 1-甲基海因低、中、高 3 个质量浓度(分别为 0.5、5、50 ng/mL)的血液,按照 1.3.2 节处理,每个质量浓度重复提取 3 次,计算每个质量浓度样品的相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)作为日内精密度。连续测定 5 d,计算每个质量浓度样品的 RSD 作为日间精密度。

2 结果

2.1 GC-MS 检测

1-甲基海因和内标得到了很好的分离,色谱峰尖锐。血液中 1-甲基海因和内标的保留时间分别为 6.922 min 和 13.279 min(图 2)。

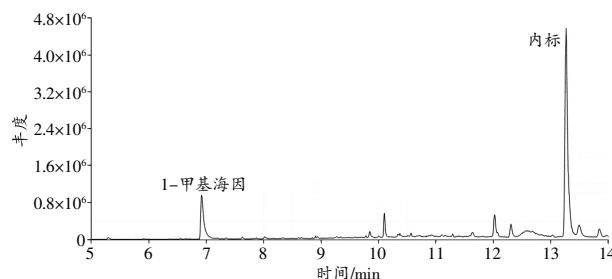


图 2 血液中 1-甲基海因和内标的 GC-MS 图

2.2 工作曲线、线性范围和最低检出限

结果显示,1-甲基海因在 0.5~50 ng/mL 范围内线性关系良好,回归方程为 $y=0.015\ 51x+0.007\ 26$ ($R^2=0.999\ 7$),最低检出限为 0.1 ng/mL。

2.3 精密度和回收率

1-甲基海因的精密度和回收率结果见表 1。

表 1 1-甲基海因的精密度和回收率 (%)

质量浓度/ (ng/mL)	精密度		回收率
	日内($n=3$)	日间($n=15$)	
0.5	6.07	13.37	108.12
5	5.09	10.57	93.02
50	4.03	9.86	93.29

2.4 案例应用

杨某,男,41 岁,被人攻击头部死亡。尸表检查:瞳孔散大,面部左侧散在点片状淡红色皮下出血,右额部片状淡红色皮下出血。尸体解剖:切开头皮见帽状腱膜下 20 cm×22 cm 范围广泛出血,左侧颞肌 4 cm×5 cm 范围出血,左颞顶部 7 cm×10 cm 范围呈粉碎性骨折,顶部有一骨折线,向右颞部延伸,长 10 cm;锯开颅骨见左颞部硬脑膜破裂,硬脑膜下血肿达 14 cm×9 cm×6 cm,蛛网膜下腔出血;肾表面凹凸不平,包膜难以剥离,切面皮髓质分界不清,皮质明显萎缩、变薄,双肾实质内多个细小囊肿,直径最大为 3 mm,未见挫伤及结石。组织病理学检验:较多肾小球纤维化,邻近的肾小管萎缩、消失,间质纤维组织增生,淋巴细胞浸润,存活的肾小球及肾小管代偿性肥大,部分区域可见血肿及浆液性囊肿结构。死者生前生化检验结果显示血肌酐 1 756 μmol/L,尿素氮 76.3 mmol/L,是名尿毒症患者。经本研究建立的方法从血样中检测出 1-甲基海因,含量为 8.78 ng/mL。

3 讨论

3.1 萃取环境的考察

本研究前期考察了 pH=2(0.01 mol/L 稀盐酸溶液)、pH=7(pH=7 的蒸馏水溶液)、pH=9(0.01 mol/L 稀盐酸溶液,振荡 2 min,加入 0.5g 碳酸铵调节 pH 值为 9)、pH=12(0.01 mol/L 的氢氧化钠溶液)情况下的萃取情况,结果显示在 pH=9 的条件下萃取效率最高。可能是由于 1-甲基海因属于生物碱,虽然其结构中有酰亚胺结构,但整体呈弱碱性。

3.2 萃取溶剂的考察

本研究前期考察了 3 种萃取溶剂,按照极性大小依次为二氯甲烷、乙酸乙酯、环己烷,其中乙酸乙酯作为萃取溶剂时,萃取效率最高。由于 1-甲基海因属于中等极性物质,所以依据相似相溶原理,中等极性的萃取溶剂乙酸乙酯相对理想。

3.3 结论

肌酐具有一定的稳定性,是临床上用于评价肾功能的主要指标,尿毒症患者会出现肌酐含量升高。而 1-甲基海因是肌酐代谢的中间产物,由肌酐在尿毒症患者的胃肠道内经过肌酐脱氨酶形成后再进入人体^[1],因 1-甲基海因在正常组织中检测不到,在炎症组织中可检测到^[12],故可结合肌酐、尿素氮含量评价肾功能。本案中,该名死者存在肾病,肌酐含量高于正常值(44~133 $\mu\text{mol/L}$),亦在死者血样中检测出肌酐的代谢产物 1-甲基海因,所以 1-甲基海因的测定对尿毒症患者相关法医学鉴定具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] 高卫民,朱吉林,米丽,等. 尿素氮、肌酐和尿酸死后生化学检测的法医学应用[J]. 中国法医学杂志,2013,28(4):297-299.
- [2] ZHU B L, ISHIDA K, QUAN L, et al. Postmortem serum uric acid and creatinine levels in relation to the causes of death[J]. Forensic Sci Int,2002,125(1):59-66.
- [3] ZHU B L, ISHIKAWA T, MICHIEUE T, et al. Evaluation of postmortem urea nitrogen, creatinine and uric acid levels in pericardial fluid in forensic autopsy[J]. Leg Med (Tokyo),2005,7(5):287-292.
- [4] UEMURA K, SHINTANI-ISHIDA K, SAKA K, et al. Biochemical blood markers and sampling sites in forensic autopsy[J]. J Forensic Leg Med,2008,15(5):312-317.
- [5] 杨波,王志娣,蒋云生,等. 普罗布考对 1-甲脒乙醇酸酐诱导 HK-2 细胞表达纤维化相关因子的影响[J]. 中南医学科学杂志,2011,39(4):390-394.
- [6] IENAGA K, YOKOZAWA T. Creatinine and HMH (5-hydroxy-1-methylhydantoin, NZ-419) as intrinsic hydroxyl radical scavengers[J]. Drug Discov Ther,2011,5(4):162-175.
- [7] 曾斌元,颜天铭,杨波. 前列腺素 E₁ 对 1-甲脒乙醇酸酐所致肾小管上皮细胞损害的保护作用[J]. 医学临床研究,2012,29(8):1491-1493.
- [8] 杨波,邓薇,蒋云生,等. 肌酐代谢产物对人肾小管上皮细胞毒性作用的比较研究[J]. 中国医师杂志,2011,13(6):738-741.
- [9] 王永生,张辉,林喆,等. RP-HPLC 测定哈蟆油中 1-甲基海因的含量[J]. 中国药学杂志,2008,43(2):146-148.
- [10] 杭太俊,于治国,范国荣. 药物分析[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2011:167-168.
- [11] YANG B, LIU D, LI C Z, et al. 1-Methylhydantoin cytotoxicity on renal proximal tubular cells *in vitro*[J]. Ren Fail,2007,29(8):1025-1029.
- [12] IENAGA K, NAKAMURA K, NAKA F, et al. The metabolism of 1-methylhydantoin via 5-hydroxy-1-methylhydantoin in mammals[J]. Biochim Biophys Acta,1988,967(3):441-443.

(收稿日期:2016-03-31)

(本文编辑:严 慧)