

微波技术用于腐败生物组织中吗啡的检测研究*

刘克林 张春水 周淑光 白燕平

公安部物证鉴定中心 北京 100038

沈伟峰 李文君

中国人民公安大学 北京 100038

〔摘要〕 本文采用微波酸水解和微波酶水解的方法,建立了一套检测腐败生物组织中吗啡的方法。与传统的水浴加热水解相比较,微波水解大大缩短了水解时间,能够使吗啡与蛋白充分解离。该方法具有快速,灵敏度、精确度和准确度高的特点,适合大批量腐败生物检材的标准化分析测定,并成功应用于一些案例的检测工作,取得了良好的效果。

〔关键词〕 微波酸水解 微波酶水解 腐败生物组织 吗啡

1 前言

海洛因是当今国际上吸、贩毒中最为常见的毒品之一。近几年来,我国吸食海洛因导致的中毒死亡案件逐年增多,国内外对于这类死亡者体液中的海洛因及其代谢产物吗啡的检测以及其在体内的分布研究已有很多报道。但是对于腐败生物组织中吗啡的检测却报道甚少,并且在实际检验中,此类案件检材中毒品成分含量少、杂质干扰大、回收率低,检验存在很大的难度。本文将微波技术应用于腐败生物组织中毒品成分吗啡的检验研究,取得了预期的效果。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CEM生产的MARS 5微波控制系统,配备14个高压微波罐,最高温度260℃,最大压力500psig;

岛津QP-5050A气质联用仪, J&W DB-5MS (30m×0.25mm×0.25um)毛细柱;

PE AutoSystem XL气相色谱仪, J&W DB-5MS (30m×0.25mm×0.25um)毛细柱, NPD检测器。

标准样品溶液:取吗啡、氘代吗啡、O⁶-单乙酰吗啡、可待因、海洛因等纯品,分别用无水乙醇配成1mg/ml的标准样品溶液。

*国家“九五”科技攻关项目中的部分研究工作

缓冲液：分别配制 PH 为 3, 5, 7, 9 的缓冲液。

衍生化试剂：MSTFA [N-甲基-(三甲基硅烷基)-三氟乙酰胺]，置于密封瓶中，贮于 4℃ 的冰箱内备用。

酶制剂：复合风味蛋白酶，置于密封瓶中，贮于 4℃ 的冰箱内备用。

溶剂：甲醇、乙醇、乙酸乙酯、氯仿、异丙醇等均为分析纯；用去离子水分别配制 2M、4M、6MHCL 溶液。

固相柱：HLB、MCX（购自 WATERS 公司，规格 300mg/3ml）。

2.2 仪器操作条件

2.2.1 微波操作条件

微波酸水解条件：5 分钟内升温至 120℃，保持 15 分钟。

微波酶水解条件：5 分钟内升温至 50℃，保持 25 分钟。

2.2.2 GC 和 GC/MS 操作条件

GC 条件：柱温 230℃，保持 1 分钟，每分钟 10℃升至 280℃，保持 10 分钟；进样口温度 260℃，检测器温度 280℃，分流比为 20：1。

GC/MS 条件：柱温 200℃，保持 1 分钟，每分钟 20℃升至 280℃，保持 10 分钟；进样口温度 260℃，接口温度 230℃；载气（氦气）压力 128KPa；分流比为 20：1；EI 离子源，电子能量 70eV，离子源温度 180℃；扫描质量范围 50～500amu。

2.3 分析步骤

2.3.1 腐败生物组织的收集与制备

称取 3 克案件收缴海洛因（含量约为 60%），溶于 1000ml 的新鲜牛奶中，一头约 50 公斤的小牛服用一小时后死亡。解剖提取牛肝组织置于大烧杯中，用塑料布封好，通风橱中自然腐败。三年后，取高度腐败的牛肝组织备检。

2.3.2 微波酸水解的步骤

准确称取 1 克检材肝组织，置于微波水解罐中，加入 10ml 2M 的 HCl 溶液，盖好密闭活塞，在微波控制系统中水解 20 分钟。

2.3.3 微波酶水解的步骤

准确称取 1 克检材肝组织，置于微波水解罐中，添加 100mg 复合风味蛋白酶，再加入 10mlPH 值为 5 的缓冲溶液，盖好密闭活塞，在微波控制系统中水解 30 分钟。

2.3.4 水浴加热酸水解的步骤

准确称取 1 克检材肝组织，置于三角烧瓶中，加入 10ml 2M 的 HCl 溶液，盖上表面皿于 80℃ 水浴中加热水解 4 小时。

2.3.5 水浴加热酶水解的步骤

准确称取 1 克检材肝组织，置于三角烧瓶中，添加 100mg 复合风味蛋白酶，再加入 10ml PH 值为 5 的缓冲液，盖上表面皿于 50℃ 水浴中加热水解 4 小时。

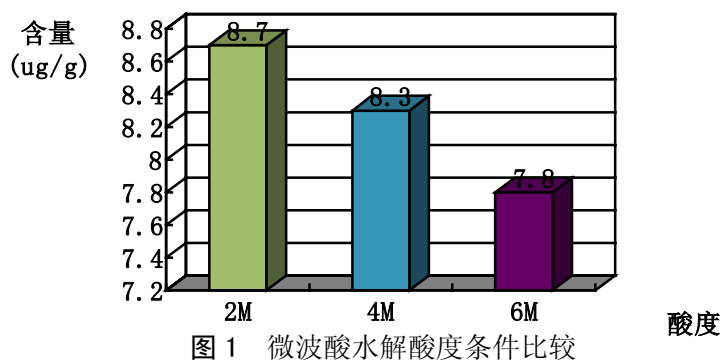
2.3.6 样品提取净化步骤

将上述水解后的溶液冷却至室温常压后转入离心试管内；加助滤剂后涡旋振荡 1 分钟；高速（8000 转/分钟）离心 30 分钟；取上清液并调节 PH 值为 8.7，备用。取 HLB 或 MCX 固相柱，用 2ml 甲醇淋洗活化后，再用 2ml 去离子水淋洗；取制备的样品溶液 2ml 过固相柱，分别用 2ml 甲醇和水洗涤除去杂质，再将固相柱吹氮气 3 分钟除去残留水分，然后用氯仿：异丙醇（9：1）或醇胺溶液 2ml 洗脱药物，收集的洗脱液在 50℃ 下用氮气吹干。用 50ul 的乙酸乙酯溶解吹干的洗脱液残渣，加入衍生化试剂 MSTFA，涡旋振荡 2 分钟后，于 70℃ 下加热 20 分钟，取 1ul 进行 GC/NPD 或 GC/MS 分析。

3 结果与讨论

3.1 微波酸水解酸度选择

分别准确称取 1 克检材肝组织，分别加入 10ml 2M、4M、6M HCl 溶液，设定微波水解条件：5 分钟升温至 120℃，保持 15 分钟，进行微波酸水解酸度试验，测定检材肝中的吗啡含量，结果详见图 1。实验表明，2M HCl 是最佳的水解酸度条件。



3.2 微波酸水解温度选择

分别准确称取 1 克检材肝组织，分别加入 10ml 2M HCl 溶液，设定微波水解条件：5 分钟升温至 80℃、100℃、120℃、140℃、160℃，保持 15 分钟，分别进行微波酸水解温度试验，测定检材肝中的吗啡含量，结果详见图 2。实验表明，120℃是最佳的水解温度条件。

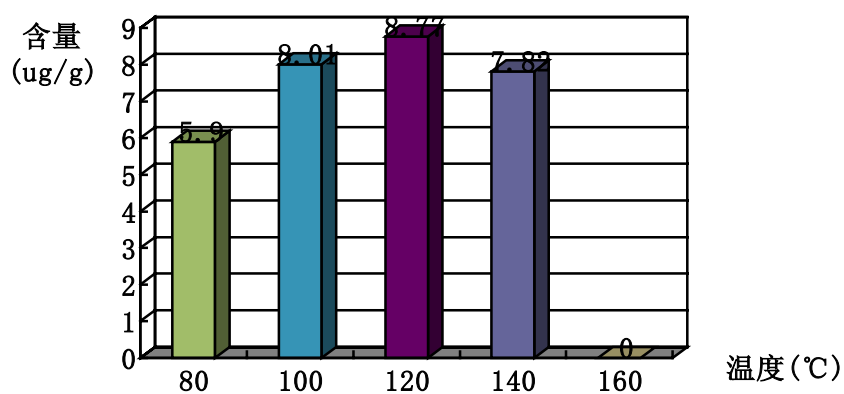


图2 微波酸水解温度条件比较

3.3 微波酸水解时间选择

分别准确称取 1 克检材肝组织，分别加入 10ml 2M HCl 溶液，设定微波水解条件：5 分钟升温至 120℃，分别保持 5、10、15、20、25、35 分钟，进行微波酸水解时间选择，测定检材肝中的吗啡含量，结果详见图 3。实验表明，微波酸水解 20 分钟是最佳的水解时间条件。

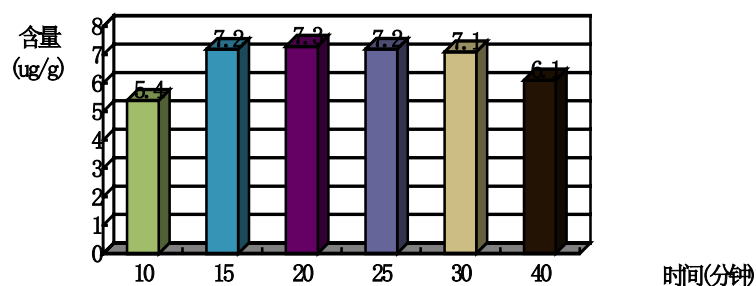


图3 微波酸水解时间条件比较

3.4 微波酶水解 PH 值选择

分别准确称取 1 克检材肝组织，分别加入 10ml pH 为 3、5、7、9 的缓冲液和 100mg 复合风味蛋白酶，设定微波水解条件：5 分钟升温至 50℃，保持 25 分钟，进行微波酶水解酸度试验，测定检材肝中的吗啡含量，结果详见图 4。实验表明，PH5 为最佳的水解酸度条件。

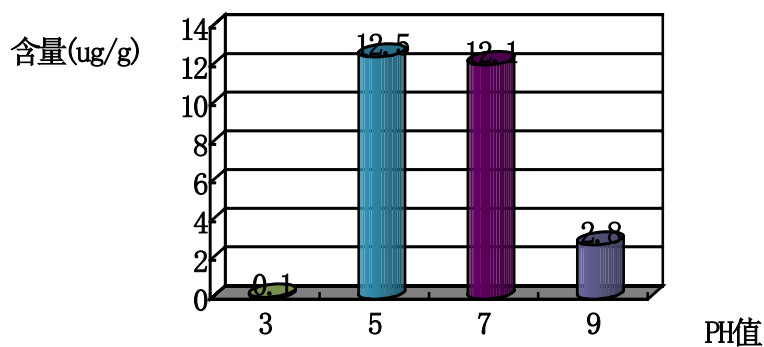


图4 微波酶水解 PH 条件比较

3.5 微波酶水解温度选择

分别准确称取 1 克检材肝组织，分别加入 10mlpH 为 5 的缓冲液和 100mg 复合风味蛋白酶，设定微波水解条件：5 分钟分别升温至 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃，保持 25 分钟，分别进行微波酶水解温度试验，测定检材肝中的吗啡含量，结果详见图 5。实验表明，50℃为最佳的水解温度条件。

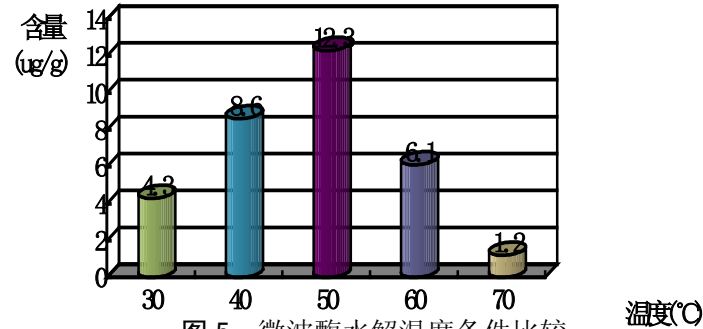


图 5 微波酶水解温度条件比较

3.6 微波酶水解时间选择

分别准确称取 1 克检材肝组织，分别加入 10mlpH 为 5 的缓冲液和 100mg 复合风味蛋白酶，设定微波水解条件：5 分钟升温至 50℃，分别保持 10、15、20、25、30、35 分钟，进行微波酶水解时间选择试验，测定检材肝中的吗啡含量，结果详见图 6。实验表明，微波酶水解 30 分钟为最佳的水解时间条件。

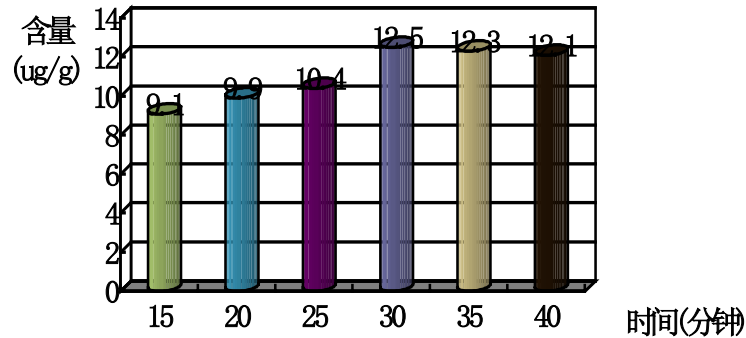


图 6 微波酶水解时间条件比较

3.7 回收率和精密度实验

分别称取 7 份 1 克的空白腐败肝组织，各添加 5ug 的吗啡，按照微波酸水解的实验条件，进行回收率和精密度的测定，结果详见下表。

序号	添加量 (ug)	检测量 (ug)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
1	5	4.1	82	77.1	4.56
2	5	3.9	78		
3	5	3.6	72		
4	5	3.8	76		
5	5	3.7	74		
6	5	4.1	82		
7	5	3.8	76		

3.8 讨论

3.8.1 海洛因经口服或注射进入体内后，经过吸收、分布和排泄，很快脱去一个乙酰基代谢为单乙酰基吗啡，再进一步代谢为吗啡。吗啡在体内少量以游离形式存在，最终大部分在体内与硫酸、葡萄糖醛酸等形成硫酸酯、葡萄糖醛酸苷等结合物，并稳定存在。因此，若要检测结合态的吗啡，必须先对样品进行水解，使吗啡从蛋白结合体中解离出来，否则很难用有机溶剂萃取或固相柱萃取。采用传统水浴加热的水解方法，不仅耗费大量的时间，而且吗啡与蛋白的解离不充分，造成回收率极低。微波技术自从七十年代末期进入化学领域之后，近年来已经取得了较大的进展，目前已广泛应用于样品中有机污染物、天然化合物及生物活性成分的提取等工作，但是对于微波技术在腐败生物组织中的毒物、毒品的应用研究，仍然没有人开展。本文将微波技术应用于腐败生物组织中吗啡的检测，采用微波酸水解和微波酶水解的方法，大大缩短了水解的时间，使吗啡与蛋白充分解离，并且建立了一套完整的检测腐败生物组织中吗啡的方法。

3.8.2 水浴加热水解和微波水解的比较

本实验进行了微波水解和水浴加热水解的比较，其结果详见图 7。微波水解的效果明显优于水浴加热的效果，这主要是由于微波是一种电磁能，它通过离子迁移和偶极子转动引起分子运动，而不改变分子结构。微波加热是一个内部加热过程，可以直接作用于介质分子，从而促使固体牛肝组织内的蛋白基本全部水解，水解液较澄清，固体悬浮物和较大颗粒沉淀物较少，吗啡回收率较高。而水浴加热是一个外部加热过程，只能作用于固体表面，通过固液体表面的热交换形成内外的温度梯度，而造成牛肝组织内的蛋白水解不完全，最终水解液较混浊，有较多的固体悬浮物和较大的固

体沉淀物，导致吗啡回收率较低。

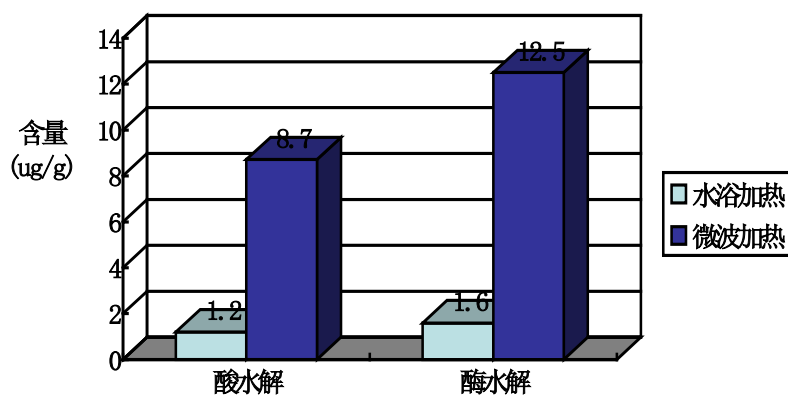


图 7 水浴加热与微波加热比较

3.8.3 本文实验采用服海洛因中毒死亡牛的腐败肝组织进行实验研究，保证了本课题所建立的实验方法真实的接近实际案件检验鉴定工作。实验研究表明：微波水解方法不仅适用于腐败生物组织中吗啡的检测，而且适用于腐败生物组织中其它毒物、毒品的检测，所建立的方法已成功地应用于检测腐败生物检材中的微量三唑仑、舒乐安定等药物，取得了较好的效果。

感谢

本文研究工作的顺利完成，得到了 CEM 公司北京办事处的武刚先生和国家肉类食品质量监督监测中心的冯晓红女士的大力支持，在此表示感谢。

参考文献

- 1、张太生 吴忠祥 陈超五 微波消解法在生物样品分析中的应用 中国环境监测 1996. 3
- 2、钟鸣文 计时华 黄幸纾 黄庭国 张和清 张德坤 生物样品的微波湿法消解研究 浙江大学学报(医学版) 1997. 5
- 3、冯育 何毅 固相萃取结合衍生化方法分析吸毒者体液中的吗啡类毒品 首届全国毒品检验技术交流会论文集 1997. 11
- 4、R.Moeller et al The detection of 6-monoacetyl morphine in urine, serum and hair by GC/MS and RIA. Forensic Sci Int.1995;70:125-133
- 5、Marlene Franke et al Exatraction of selected drugs from serum using microwave irradiation Forensic Sci Int.1996;81:51-59

Determination of Morphine in Decayed Biological Tissue by Microwave technology

Liu kelin ,Zhang chunshui ,Zhou shuguang ,Bai yanping

Institute of Forensic Science of Public Security Ministry

Beijing 100038

Shen weifeng ,Li wenjun

Chinese People' s Public Security University Beijing 100038

[Abstract] A method for determination of morphine in decayed biological tissue by microwave acid-hydrolysis and microwave enzyme- hydrolysis was set up. By comparison with traditional hydrolysis waterbath-heating, microwave hydrolysis greatly decreased hydrolysis time and could separate morphine from protein in tissue sufficiently. The method is rapid ,sensitive and accurate .It is fit for the standard determination of mass decayed biological samples. The method has been applied to some cases successfully and has been shown to be satisfactory.

[Key words] microwave acid-hydrolysis, microwave enzyme- hydrolysis , decayed biological tissue ,morphine