



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115452995 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 19

(21) 申请号 202211166882.X

(22) 申请日 2022.09.23

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115452995 A

(43) 申请公布日 2022.12.09

(73) 专利权人 司法鉴定科学研究院
地址 200063 上海市普陀区光复西路1347号

(72) 发明人 徐多麒 沈敏 向平 严慧
纪佼佼

(74) 专利代理机构 上海申新律师事务所 31272
专利代理师 郎祺

(51) Int. Cl.
G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/06 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103207242 A, 2013.07.17
CN 109507354 A, 2019.03.22
CN 109507355 A, 2019.03.22
CN 111208247 A, 2020.05.29
CN 111656165 A, 2020.09.11
CN 109142576 A, 2019.01.04
CN 111983222 A, 2020.11.24
CN 111487336 A, 2020.08.04
CN 108287206 A, 2018.07.17
CN 112525641 A, 2021.03.19
CN 113092615 A, 2021.07.09
CN 103592400 A, 2014.02.19
CN 112630363 A, 2021.04.09
CN 113325103 A, 2021.08.31
CN 114544824 A, 2022.05.27

审查员 李立彦

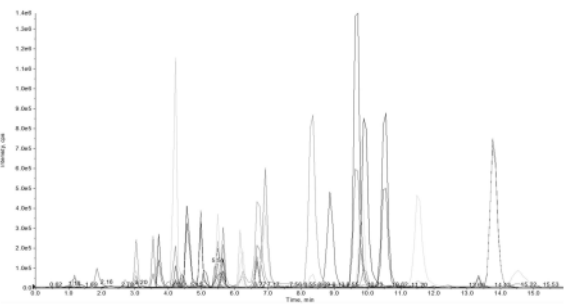
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种检验单根亚毫米长度毛发中药物的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检验单根亚毫米长度毛发中药物的方法,该方法包括如下步骤:步骤一,将单根头发沿刻度粘贴在定制胶带上,并在台式放大镜下进行分割;步骤二,采用提取溶液对步骤一分割后的样本进行提取,为保证提取回收率,提取过程包括超声、孵育,提取后将提取上清液制得样本液;步骤三,用液质联用仪对步骤二所得的样本液进行液相色谱-质谱分析。本发明实现了对单根头发进行亚毫米样本的制备,且样本偏差在可接受范围内。本发明的方法不仅可以有效地破坏头发角质层屏障来提取头发内目标药物,此外还能够在最大范围内使大量结构不同的目标检测物质溶出,从而在检测目标不确定、检测范围广泛时能够实现对样本中的多种毒(药)物的快速筛查。



CN 115452995 B

1. 一种检验单根亚毫米长度毛发中药物的方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一,将单根头发沿刻度粘贴在定制胶带上,并在台式放大镜下进行分割;所述定制胶带采用的定制精度为0.4mm;

步骤二,采用水溶性有机溶剂和水溶性蛋白酶的混合溶液作为提取溶液对步骤一分割后的样本进行提取,为保证提取回收率,提取过程包括超声、孵育,提取后将提取上清液制得样本液;

所述水溶性有机溶剂为甲醇、乙腈和2mM甲酸铵混合而成的EM溶液;所述水溶性蛋白酶为二硫苏糖醇DTT;所述EM溶液中甲醇、乙腈、2mM甲酸铵的体积比为25:25:50(v/v/v);EM-DTT溶液中二硫苏糖醇的浓度为1-100mg/mL;

步骤三,用液质联用仪对步骤二所得的样本液进行液相色谱-质谱分析。

2. 根据权利要求1所述的检验单根亚毫米长度毛发中药物的方法,其特征在于,步骤一中,所述台式放大镜的放大倍数为30×。

3. 根据权利要求1所述的检验单根亚毫米长度毛发中药物的方法,其特征在于,步骤二中,所述提取溶液的体积为25-50 μ L。

4. 根据权利要求1所述的检验单根亚毫米长度毛发中药物的方法,其特征在于,步骤二中,所述超声的温度为15-35℃,时间为30-60min;所述孵育的时间为10-20h。

一种检验单根亚毫米长度毛发中药物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及痕量药物检测技术领域,尤其涉及一种检验单根亚毫米长度毛发中药物的方法。

背景技术

[0002] 自20世纪90年代末以来,毛发分析已越来越多地应用于法医、临床及反兴奋剂领域。与传统的尿液和血液等生物基质相比,毛发分析具有样本收集无创、简便,毒(药)物检测时间窗长等突出优势。因此,毛发分析结果在案件调查中常作为重要的证据,为案件提供侦察方向及时间信息。既往的分析方法集中在对簇发进行片段分析,多选用2~3cm长度作为间隔分割。传统的分割模式仅能对一段时间段内的摄药情况进行分析,不能够得到确切的时间信息。因此,实际工作中,迫切需要一种能够对单次摄入药物后,对头发中微量药物的分析方法。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对现有技术中的不足,提供。

[0004] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案是:

[0005] 本发明提供一种检验单根亚毫米长度毛发中药物的方法,包括如下步骤:

[0006] 步骤一,将单根头发沿刻度粘贴在定制胶带上,并在台式放大镜下进行分割;

[0007] 步骤二,采用水溶性有机溶剂和水溶性蛋白酶的混合溶液作为提取溶液对步骤一分割后的样本进行提取,为保证提取回收率,提取过程包括超声、孵育,提取后将提取上清液制得样本液;

[0008] 步骤三,用液质联用仪对步骤二所得的样本液进行液相色谱-质谱分析。

[0009] 进一步地,步骤一中,所述定制胶带采用的定制精度为0.1-1.0mm。

[0010] 进一步优选地,步骤一中,所述定制胶带采用的定制精度为0.4mm。

[0011] 进一步地,步骤一中,所述台式放大镜的放大倍数为30×。

[0012] 本发明经过大量实验发现,上述步骤一的方法能够较为准确、便捷的将单根毛发进行亚毫米级分割、收集。采用其他的样品制备方法,在实际操作、样本稳定性、收集等方面均存在一定难题。本发明对样本长度不作严格限制,在实施方式中,所述样本可以为0.1-1mm。对定制胶带的材质、类别不作严格限制,在实施过程中,可以为透明胶带、非透明胶带、纸质材质、塑料材质等。

[0013] 进一步地,步骤二中,所述水溶性有机溶剂为甲醇、乙腈和2mM甲酸铵混合而成的EM溶液;所述水溶性蛋白酶为二硫苏糖醇DTT。

[0014] 本发明经大量研究发现,与其他多种有机试剂相比,采用EM-DTT溶剂可获得高提取回收率,优势明显。采用EM-DTT溶液时,通过破坏头发角质层屏障来提取头发内目标药物。

[0015] 进一步优选地,所述EM溶液中甲醇、乙腈、2mM甲酸铵的体积比为25:25:50(v/v/

v)。

[0016] 进一步优选地,步骤二中,EM-DTT溶液中二硫苏糖醇的浓度为1-100mg/mL。

[0017] 进一步地,步骤二中,所述提取溶液的体积为25-50 μ L。更优选为25 μ L。

[0018] 进一步地,步骤二中,所述超声的温度为15-35 $^{\circ}$ C,时间为30-60min,更优选为60min;所述孵育的时间为10-20h,更优选为20h。

[0019] 本发明采用以上技术方案,与现有技术相比,具有如下技术效果:

[0020] 本发明实现了对单根头发进行亚毫米样本的制备,且样本偏差在可接受范围内。

[0021] 本发明的方法在采用水溶性有机溶剂和水溶性蛋白酶的混合溶液对样本进行提取后再利用超声、孵育等技术对目标药物进行提取,不仅可以有效地破坏头发角质层屏障来提取头发内目标药物,此外还能够在最大范围内使大量结构不同的目标检测物质溶出,从而在检测目标不确定、检测范围广泛时能够实现对样本中的多种毒(药)物的快速筛查。

[0022] 本发明所述的单根亚毫米头发样品制备方法具有优异的选择性、线性相关性、精密度和准确度。

附图说明

[0023] 图1为本发明中42种常见精神药品分析结果。

具体实施方式

[0024] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,但不作为本发明的限定。需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0025] 实施例1

[0026] 一种检验单根亚毫米长度毛发中药物的方法,包括如下步骤:

[0027] 1.样品制备

[0028] 取单根头发样品(毛根+毛干)用丙酮进行横向擦拭。将定制的透明胶带用图钉固定泡沫板上,粘性面向上。将单根头发沿刻度粘贴在精度为0.4mm的透明胶带上。将粘好头发的样本固定在干净的白色打印纸上。并在台式放大镜(30 $\times$)下,用手术剪刀进行分割。采用精度为0.01mm的电子微分尺对毛发段进行精准测量。经测定,毛发段长度为 0.4 ± 0.02 mm(n=50)。单根0.4mm毛发段放置于200 μ L管中。

[0029] 2.0.4mm单根头发中药物提取

[0030] 在200 μ L管中填入25 μ L含有内标的EM-DTT溶液(EM溶液中甲醇、乙腈、2mM甲酸铵的体积比为25:25:50(v/v/v),EM-DTT溶液中二硫苏糖醇的浓度为10mg/mL),室温下超声处理1h后,孵育20h。将上清液转移到自动进样瓶内,取10 μ L注入UPLC/MS-MS系统。

[0031] 3.用液质联用仪进行液相色谱-质谱分析

[0032] 1)液相方法

[0033] 液相色谱柱为RestekAllure PFPP五氟苯基柱(100 $\times$ 2.1mm,5 μ m);流动相A为含0.1%甲酸的20mmol/L乙酸铵水溶液,B为乙腈,梯度洗脱如表1所示。流速为0.2mL/min,进样量10 μ L,总采样时间12min。

[0034] 表1.色谱流动相梯度

	时间 (min)	流速 (mL/min)	A%	B%
[0035]	Initial	0.2	75	25
	1	0.2	75	25
	8	0.4	50	50
	14	0.4	10	90
[0036]	14.5	0.4	75	25
	16	0.2	75	25

[0037] 2) 质谱方法

[0038] 采用电喷雾电离-正离子模式 (ESI+), 多反应监测模式 (MRM) 检测。操作参数如下:
离子喷雾电压 (ISV): 5500V; 离子源温度 (TEM): 450°C; 气帘气: 40psi; 雾化气 (GS1)、辅助气 (GS2): 35psi (1psi ≈ 6.9kPa)。LC/MS-MS 参数见表2。

[0039] 表2. 分析物及内标MS/MS参数

	分析物	母离子 质荷比 (m/z)	定量离子对质 荷比 (m/z)	去簇电压 (V)	碰撞电压 (eV)	保留 时间
[0040]	安非他明	136.1	<u>119.1</u>	60	11	5.24
			91.1		22	
	甲基苯丙胺	150.1	<u>119.1</u>	50	14	6.39
			91.1		23	
	氯胺酮	238.1	<u>179.1</u>	60	24	6.63
			125.1		35	
	吗啡	286.1	<u>201.2</u>	80	35	2.62
			165.3		52	
	6-单乙酰基吗啡	328.1	<u>211.3</u>	80	36	4.70
			165.3		48	
	可卡因	304.1	<u>182.2</u>	60	28	6.56
			150.2		35	
	苯甲酰爱康宁	290.2	<u>168.3</u>	70	26	1.40
			105.2		43	
	麦角酸酐二乙胺	324.2	<u>223.2</u>	60	33	5.77
			208.2		43	
	芬太尼	150.0	<u>91.1</u>	20	27	3.76
			133.1		13	
	地芬尼多	310.0	<u>292.6</u>	60	26	8.03
			129.4		40	
	氟硝西泮	314.2	<u>268.3</u>	60	35	6.15
			239.3		45	
	7-氨基氟硝西泮	284.2	<u>135.2</u>	60	39	3.62
			226.2		41	
	三唑仑	343.2	<u>308.2</u>	60	36	5.46
			315.2		35	
	羟基-三唑仑	359.2	<u>331.2</u>	60	38	4.13

		176.1		37	
		<u>199.2</u>		40	
可待因	300.2	165.3	80	52	3.78
		<u>193.3</u>		45	
地西洋	285.1	154.1	80	36	6.65
		<u>140.2</u>		36	
去甲西洋	271.2	208.1	70	36	5.44
		<u>255.2</u>		36	
替马西洋	301.2	283.1	70	19	5.52
		<u>241.2</u>		31	
奥沙西洋	287.2	269.3	50	21	4.42
		<u>281.1</u>		33	
阿普唑仑	309.1	274.2	60	32	5.46
		<u>297.2</u>		35	
a-羟基-阿普唑仑	325.2	279.2	70	33	4.17
		<u>270.1</u>		36	
氯硝西洋	316.2	214.1	60	49	5.36
		<u>222.2</u>		34	
7-氨基-氯硝西洋	286.1	250.1	40	25	2.92
		<u>267.3</u>		34	
艾司唑仑	295.2	205.2	50	53	4.84
		<u>275.1</u>		30	
[0041] 劳拉西洋	321.1	303.1	50	21	4.60
		<u>291.4</u>		37	
咪达唑仑	326.2	244.2	50	37	9.39
		<u>236.2</u>		35	
硝基安定	282.2	180.2	50	32	5.05
		<u>121.1</u>		52	
7-氨基硝西洋	252.1	146.2	60	37	2.90
		<u>235.1</u>		38	
唑吡坦	308.1	263.2	40	53	9.29
		<u>109.2</u>		35	
西酞普兰	325.3	262	60	41	13.32
		<u>167.2</u>		26	
苯海拉明	256.2	165.2	30	17	13.64
		<u>147.2</u>		54	
右美沙芬	272.3	213.3	60	42	12.31
		<u>270.1</u>		28	
氯氮平	327.3	296.3	70	32	10.90
		<u>138.3</u>		33	
东莨菪碱	304.3	156.3	60	31	4.34
		<u>68.1</u>		23	
右美托咪定	201.1	94.8	60	40	9.39
		<u>58</u>		24	
曲马多	264.2		50		8.46

[0042]	安替比林	189.0	246.2	60	37	2.59
			<u>56</u>		16	
			77		27	
	卡马西平	237.3	<u>194.3</u>	60	37	4.16
			192.3		26	
	奥卡西平	253.0	<u>235.9</u>	70	32	3.47
			208.1		19	
	尼美西泮	296.1	<u>250.2</u>	70	20	6.13
			222.1		36	
	喹硫平	384.4	<u>253.1</u>	54	30	10.10
			221		35	
	米氮平	266.1	<u>195.1</u>	80	37	7.81
			208.8		35	
	氯胺酮-d4	242.2	183.1	60	26	6.81
			129.2		40	
	地西泮-d5	290.2	198.2	60	46	6.50
			154.4		40	
	喹硫平-d8	392.2	258.1	40	31	10.30
			226.1		50	

[0043] 3) 方法验证

[0044] 此外,本发明还实施了一系列试验以对本发明所述方法进行验证,主要包括验证本发明所述方法的选择性、线性相关性及其定量限等分别如下文所述:

[0045] 在分析物和ISs的保留时间内,没有观察到内源性化合物的干扰。所有分析物均具有良好的线性关系($R>0.99$)。LOD范围为0.1-10pg/mm, LLOQ范围为0.5-20pg/mm。该方法覆盖的42种分析物中有26种(约62%) LLOQ为 ≤ 5 pg/mm, 8种分析物(20%)为 ≤ 1 pg/mm。各分析物的回归方程、LOD、LLOQ及相关系数见表3。

[0046] 表3. 头发中42种精神活性物质及代谢物的回归方程、相关系数、LOD和LLOQ

分析物	线性范围	回归方程	相关系数 (R)	LOD (pg/mm)	LLOQ (pg/mm)	
	(pg/mm) (n=3)					
[0047]	安非他明	5 - 500	y=0.21x+3.04	0.993	2	5
	甲基苯丙胺	20 - 500	y=0.74x+4.80	0.994	5	20
	氯胺酮	10 - 500	y=1.22x+2.14	0.998	2	10
	吗啡	20 - 500	y=0.02x+0.67	0.993	10	20
	6-单乙酰基吗啡	20 - 500	y=0.004x+0.55	0.993	5	20
	可卡因	5 - 500	y=1.95x+3.12	0.994	2	5

[0048]	苯甲酰爱康宁	2 - 500	$y=2.72x+0.91$	0.998	1	2
	麦角酸酐二乙胺	1 - 500	$y=2.36x+0.43$	0.998	0.5	1
	芬太尼	20 - 500	$y=1.15x-9.79$	0.990	10	20
	地芬尼多	10 - 500	$y=1.33x+2.88$	0.993	2	10
	氟硝西洋	2 - 500	$y=0.04x-0.06$	0.995	0.5	2
	7-氨基氟硝西洋	2 - 500	$y=0.07x-0.15$	0.997	0.5	2
	三唑仑	1 - 500	$y=0.06x-0.03$	0.994	0.2	1
	羟基-三唑仑	5 - 500	$y=0.01x+0.01$	0.994	1	5
	可待因	20 - 500	$y=0.06x+1.22$	0.999	5	20
	地西洋	1 - 500	$y=0.31x+1.08$	0.995	0.2	1
	去甲西洋	5 - 500	$y=0.12x+2.32$	0.994	1	5
	替马西洋	10 - 500	$y=0.54x+1.57$	0.996	5	10
	奥沙西洋	20 - 500	$y=0.08x+6.03$	0.997	10	20
	阿普唑仑	2 - 500	$y=0.51x+1.62$	0.996	0.5	2
	a-羟基-阿普唑仑	10 - 500	$y=0.13x+0.99$	0.991	2	10
	氯硝西洋	5 - 500	$y=0.20x+1.84$	0.995	1	5
	7-氨基-氯硝西洋	2 - 500	$y=0.16x+1.34$	0.993	1	2
	艾司唑仑	1 - 500	$y=1.34x+0.22$	0.999	0.2	1
	劳拉西洋	20 - 500	$y=0.05x+0.46$	0.997	10	20
	咪达唑仑	1 - 500	$y=2.80x+0.31$	0.998	0.5	1
	硝基安定	5 - 500	$y=0.23x+1.19$	0.994	2	5
	7-氨基硝西洋	10 - 500	$y=0.54x+8.25$	0.994	5	10
	唑吡坦	0.5 - 500	$y=6.17x+0.22$	0.995	0.1	0.5
	西酞普兰	2 - 500	$y=7.3x+1.56$	0.998	0.5	2
	苯海拉明	2 - 500	$y=0.79x+1.30$	0.998	1	2
	右美沙芬	10 - 500	$y=0.24x+7.10$	0.994	2	10
	氯氮平	2 - 500	$y=2.49x+6.65$	0.994	1	2
	东莨菪碱	0.5 - 500	$y=1.57x - 0.12$	0.996	0.2	0.5
	右美托咪定	5 - 500	$y=0.33x+2.03$	0.994	2	5
	曲马多	20 - 500	$y=0.56x+7.07$	0.997	10	20
	安替比林	20 - 500	$y=0.02x+2.47$	0.995	5	20
	卡马西平	5 - 500	$y=2.12x+1.42$	0.998	2	5
	奥卡西平	10 - 500	$y=0.34x+6.42$	0.995	5	10
	尼美西洋	2 - 500	$y=0.52x+0.49$	0.996	1	2
	喹硫平	2 - 500	$y=6.66x+1.31$	0.994	1	2
	米氮平	0.5 - 500	$y=4.56x+0.02$	0.997	0.2	0.5

[0049] 上所述仅为本发明较佳的实施例,并非因此限制本发明的实施方式及保护范围,对于本领域技术人员而言,应当能够意识到凡运用本发明说明书内容及图示所作出的等同替换和显而易见的变化所得到的方案,均应当包含在本发明的保护范围内。

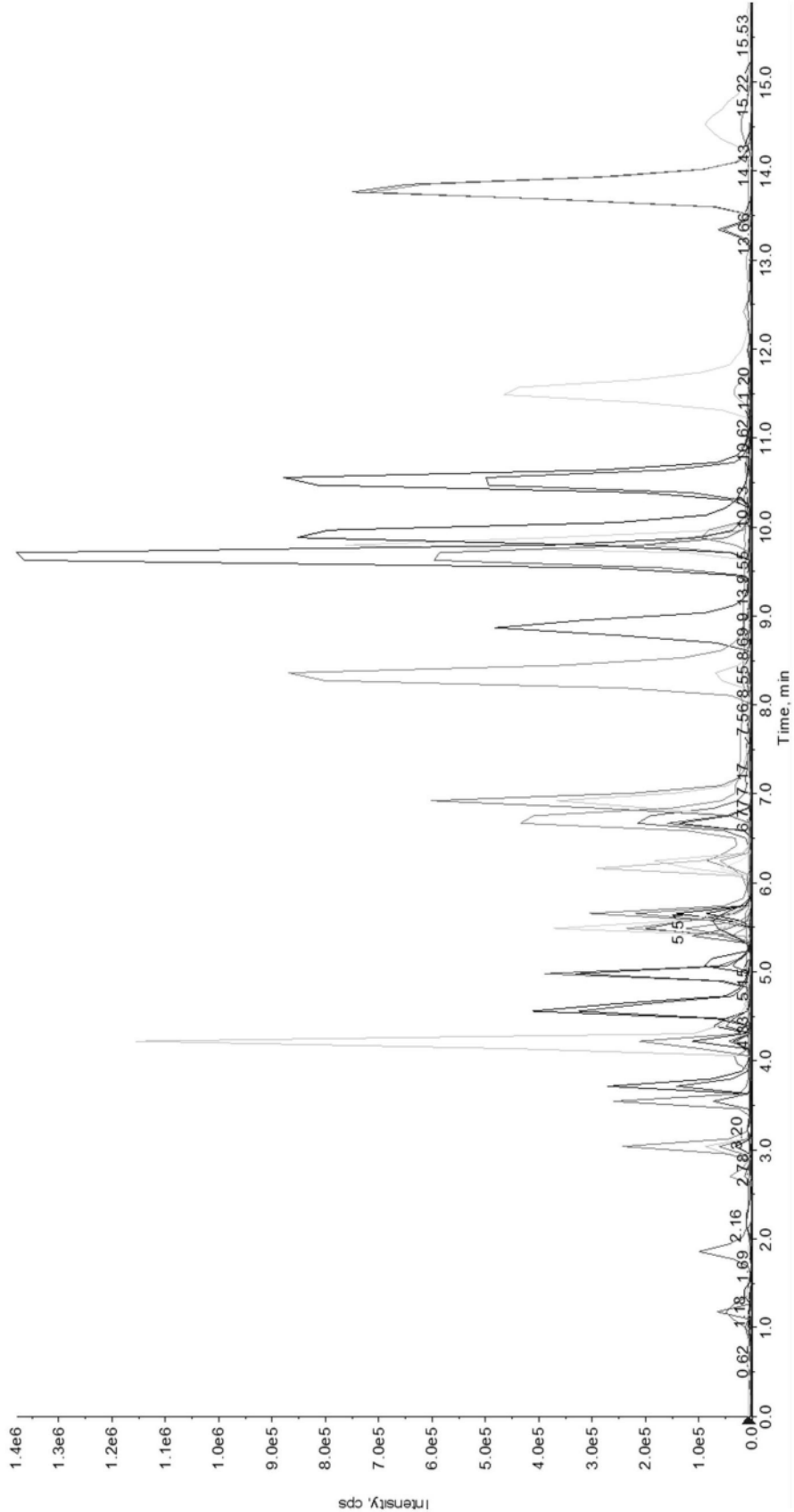


图1