

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2021008079

化学试剂, 2021, 43(8), 1111~1116

超高效液相色谱-串联质谱法测定毛发中 4 种苯丙胺类兴奋剂含量的不确定度评估

胡骏杰^{* 1a, 1b}, 马文俊^{1b}, 刘飞², 朱军^{1a, 1b}, 张润生³

(1. 济宁医学院 a. 司法鉴定中心, b. 法医学与医学检验学院, 山东 济宁 272067;

2. 南京大学 化学化工学院, 生命分析化学国家重点实验室, 江苏 南京 210023;

3. 上海市公安局 物证鉴定中心, 上海 200083)

摘要: 建立了毛发中 4 种苯丙胺类兴奋剂的超高效液相色谱-串联质谱外标定量检测方法, 并对该方法进行了不确定度评估。通过分析整个实验过程, 从标准溶液配制、样品配制、线性拟合、样品处理过程、基质效应等方面确定不确定度来源, 量化各不确定度分量, 并进行合成与扩展。结果表明, 毛发中苯丙胺类兴奋剂测定结果不确定度最主要的来源为标准曲线拟合。基于司法鉴定工作需要, 特别给出了毛发中 4 种苯丙胺类兴奋剂在成瘾认定含量阈值(0.2 ng/mg)处完整的不确定度报告, 各物质扩展不确定度为 0.024 0~0.035 6 ng/mg。该评估结果可为吸毒成瘾认定案件的法医鉴定工作提供有效参考信息。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 毛发; 苯丙胺类兴奋剂; 外标定量; 不确定度; 吸毒成瘾认定

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2021)08-1111-06

Uncertainty Evaluation for the Determination of Four Amphetamine-type Stimulants in Hair by Ultra-performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry HU Jun-jie^{* 1a, 1b}, MA Wen-jun^{1b}, LIU Fei², ZHU Jun^{1a, 1b}, ZHANG Run-sheng³ (1a. Judicial Expertise Center, 1b. College of Forensic Medicine and Laboratory Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China; 2. State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China; 3. Center for Evidence Authentication, Shanghai Municipal Public Security Bureau, Shanghai 200083, China), Huaxue Shiji, 2021, 43(8), 1111~1116

Abstract: A method was developed for quantitative detection of four amphetamine-type stimulants (ATSS) in hair by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) combined with the external standard, and the uncertainty of the method was evaluated. Through the analysis of the entire experimental process, the uncertainty source is determined from the standard solution preparation, sample preparation, linear fitting, sample processing process, matrix effect, etc. Each uncertainty component is quantified, synthesized and expanded. The results showed that the main source of uncertainty in the determination of ATSS in hair was standard curve fitting. Based on the needs of forensic appraisal, a complete uncertainty report of the four ATSS in the hair at the addiction determination threshold (0.2 ng/mg) was especially given, and the expanded uncertainty of each substance was 0.024 0~0.035 6 ng/mg. The evaluation results can provide effective reference information for the forensic identification of drug addiction cases.

Key words: UPLC-MS/MS; hair; ATSS; quantitative detection with the external standard; uncertainty; identification of drug addiction

近年来,我国苯丙胺类兴奋剂(Amphetamine-type stimulants, ATSS)的滥用及成瘾人数迅速增长^[1]。根据《2019 年中国毒品形势报告》^[2],截至

2019 年底,在 214.8 万名现有吸毒人员中,滥用冰毒(甲基苯丙胺)人员数量位居首位,达 118.6 万,占 55.2%。苯丙胺类兴奋剂对中枢神经和交

收稿日期: 2021-01-01; 网络首发日期: 2021-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21904049); 国家级大学生创新训练计划项目(201910443005); 济宁医学院大学生创新训练计划项目(cx2019061); 山东省高等学校科技计划项目(J18KB047); 济宁医学院教师扶持基金资助项目(JYFC2018FY005)。

作者简介: 胡骏杰(1990-),女,山东济宁人,博士,讲师,主要研究方向为法医毒物分析, E-mail: hujunjie0130@126.com。

引用本文: 胡骏杰, 马文俊, 刘飞, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定毛发中 4 种苯丙胺类兴奋剂含量的不确定度评估[J]. 化学试剂, 2021, 43(8): 1111-1116。

感神经具有很强的兴奋和致幻作用^[3-5],其滥用和成瘾不仅严重危害吸毒者个体健康,还会引发一系列社会公共安全问题^[6,7]。

为加强对苯丙胺类兴奋剂及其他滥用物质的监管,使禁毒工作更加高效有序开展,国家禁毒办于 2016 年 11 月对《吸毒成瘾认定办法》进行了修订,将毛发中毒品及代谢物的检测结果作为吸毒成瘾认定新标准;公安部于 2018 年 11 月印发了《涉毒人员毛发样本检测规范》(公禁毒[2018]938 号),对相关物质的成瘾认定阈值作出了明确规定,其中,毛发中甲基苯丙胺、苯丙胺、3,4-亚甲基二氧基苯丙胺(MDA)及 3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺(MDMA)的检测含量阈值均为 0.2 ng/mg^[8]。因此,司法鉴定案件中对吸毒成瘾的认定应建立在定量分析基础之上,以阈值作为判定标准。当检测结果在阈值附近时,对测量结果准确性及可靠性的评估十分重要。

不确定度分析是国际上推荐的用于定量评估测量结果的有效手段^[9],不确定度大小决定了定量分析结果的实用价值^[10,11]。为满足禁毒工作的实际需求,提高法医毒物司法鉴定结果质量,本工作基于相关标准^[12]、文献报道^[13-15]及实战经验,建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)外标法检测毛发中苯丙胺类兴奋剂含量,并根据技术规范《测量不确定度评定与表示》(JJF 1059.1—2012)要求^[16],分析实验过程中的不确定因素来源并对其分别进行量化评定。文章特别给出了毛发中 4 种苯丙胺类兴奋剂在成瘾认定阈值含量(0.2 ng/mg)处的完整不确定度评估报告,以期对吸毒成瘾认定案件的司法鉴定工作提供有效参考信息。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

SCIEX QTRAP[®] 5500 型超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);Biotage[®] Lysera 型高效样品破碎仪(瑞典 Biotage 公司);KQ-100 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);FA2014 型电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);10~100、100~1 000、500~5 000 μ L Genex 系列单通道移液器(美国 BIO-DL 有限公司)。以上仪器均已检定校准且在有效期内。

标准物质:苯丙胺(甲醇溶液,(1.000 $\pm$ 0.006) mg/mL)、甲基苯丙胺(甲醇溶液,(1.000 $\pm$

0.006) mg/mL)、3,4-亚甲基二氧基苯丙胺(甲醇溶液,(1.000 $\pm$ 0.006) mg/mL)、3,4-亚甲基二氧甲基苯丙胺(甲醇溶液,(1.000 $\pm$ 0.006) mg/mL)(美国 Cerilliant 标准物质公司);乙酸铵(质谱级)、甲酸(色谱纯)、甲醇(色谱纯)(德国 Merck 公司);实验用水为超纯水,所用空白毛发(头发)由无吸毒史的健康志愿者提供。

1.2 标准溶液配制

以 10~100 μ L 移液器精密吸取浓度为 1.000 mg/mL 的苯丙胺、甲基苯丙胺等 4 种苯丙胺类兴奋剂标准品各 100 μ L 至 25 mL 容量瓶,以甲醇稀释至刻度,混匀,配制浓度为 4.0 μ g/mL 的混标储存液 A。

取 6 个 10 mL 容量瓶,编号为 1~6;首先以 10~100 μ L 移液器精密吸取 100 μ L 储存液 A 至 1 号容量瓶,以甲醇稀释至刻度,配制浓度为 40 ng/mL 的标准浓度混标溶液;采用逐级稀释法,以 500~5 000 μ L 移液器分别从配制完成的标准溶液 1、2、3、4、5 中依次移取 5、5、4、5、5 mL 溶液至 2、3、4、5、6 号瓶,并以甲醇稀释至刻度,获得浓度为 20、10、4.0、2.0、1.0 ng/mL 的标准浓度混标溶液。

1.3 样品前处理

以电子分析天平准确称取 20 mg 毛发样品,转移至内含撞珠的研磨管中;以 100~1 000 μ L 移液器向研磨管中加入 1.0 mL 甲醇,3 400 r/min 转速下研磨破碎 2 min;超声提取 2 h 后,以 0.22 μ m 有机相滤膜过滤研磨液,然后进行 UPLC-MS/MS 分析。

标准含量毛发样品的配制:分别向 6 份 20 mg 空白毛发中加入 1.0 mL 浓度为 1.0、2.0、4.0、10、20、40 ng/mL 的标准浓度混标溶液,获得标准添加含量为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 ng/mg 的毛发样品,后续操作同上,根据各物质定量离子对峰面积-含量关系,建立标准工作曲线。

1.4 实验条件

超高效液相色谱条件:Phenomenex Kinetex[®] Biphenyl 色谱柱(100 mm $\times$ 3.0 mm,2.6 μ m);流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸水溶液,流动相 B 为甲醇,流速为 0.5 mL/min;进样量为 2 μ L;柱温为 40 $^{\circ}$ C;梯度洗脱程序:初始~1.0 min,5% B;1.0~1.5 min,5%~20% B;1.5~9.0 min,20%~95% B;9.0~11.0 min,95% B;11.0~11.1 min,95%~5% B;11.1~14.0 min,5% B。

质谱条件: 离子源: ESI 源; 扫描方式: 多反应监测模式(MRM), 正离子模式; 离子源参数: 离子源电压(IS): 5 500 V; 离子源温度: 500 ℃。4 种苯丙胺类兴奋剂的 MRM 参数及保留时间见表 1。

表 1 4 种苯丙胺类兴奋剂的 MS/MS 采集参数及保留时间^注

Tab.1 MS/MS acquisition parameter and retention time of four ATSS

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇 电压/V	碰撞 能量/eV	保留 时间/min
苯丙胺	136.1	119.1 [*] 91.1	40	13 25	4.10
甲基苯丙胺	150.1	119.1 [*] 91.1	30	16 26	4.51
MDA	180.1	163.1 [*] 135.1	40	16 26	4.52
MDMA	194.2	163.1 [*] 105.1	35	18 34	4.87

注: * 表示定量离子。

1.5 数学模型建立

根据苯丙胺类兴奋剂的校准曲线方程, 得到毛发中相应物质的含量计算公式为:

$$X = [Y - a] / b \times f_{RE} \times f_{ME}$$

式中: Y 为待测毛发样品中苯丙胺类兴奋剂的定量离子对峰面积; a 为曲线截距; b 为曲线斜率; X 为待测毛发样品中苯丙胺类兴奋剂含量, ng/mg; f_{RE} 为提取回收率校正因子; f_{ME} 为基质效应校正因子。

2 结果与讨论

2.1 不确定度的来源分析

在 UPLC-MS/MS 检测毛发中苯丙胺类兴奋剂实验过程中, 对实验结果不确定度的主要来源分析如下: 1) 标准溶液配制过程中引入的不确定度: 源于苯丙胺类兴奋剂标准品浓度的不确定度、标准溶液配制过程中移液器和容量瓶使用引入的不确定度; 2) 样品配制过程引入的不确定度: 包括毛发样品称量时电子分析天平的不确定度、加入提取溶剂时移液器引入的不确定度; 3) 线性拟合过程引入的不确定度; 4) 样品处理过程和基质效应引入的不确定度。

2.2 相对不确定度分量的评定

2.2.1 标准溶液配制引入的相对不确定度 $u_{rel}(1)$

由 2.1 分析可知, $u_{rel}(1)$ 来源于标准品浓度的相对不确定度 $u_{rel}(S)$ 、标准浓度混标溶液配制过程中移液器引入的不确定度 $u_{rel}(V_1)$ 及定容时容量瓶产生的不确定度 $u_{rel}(V_2)$ 。

$$u_{rel}(1) = \sqrt{u_{rel}^2(S) + u_{rel}^2(V_1) + u_{rel}^2(V_2)}$$

标准品浓度引入的相对不确定度 $u_{rel}(S)$: 4 种苯丙胺类兴奋剂标准品的浓度均为 1.000 mg/mL, 扩展不确定度 0.006 mg/mL, 扩展因子 $k=2$, 则对于每种目标物, 由标准品浓度引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(S) = 0.006 / (1.000 \times 2) = 0.003$$

移液器引入的相对不确定度 $u_{rel}(V_1)$: 由 1.2 可知, 系列浓度混标标准溶液配制过程中使用 10~100 μ L 移液器 5 次, 500~5 000 μ L 移液器 5 次, 其在 100 μ L 和 5 000 μ L 量程的容量允差分别为 $\pm 2.0 \mu$ L 和 $\pm 30 \mu$ L, 产生的不确定度统计服从均匀分布, 取包含因子 $k=\sqrt{3}$, 则 10~100 μ L 移液器及 500~5 000 μ L 移液器引入的相对不确定度分别为:

$$u_{rel}(V_{100 \mu L}) = 2.0 / (100 \times \sqrt{3}) = 0.01155$$

$$u_{rel}(V_{5000 \mu L}) = 30 / (5000 \times \sqrt{3}) = 0.003464$$

移液器使用引入的相对不确定度 $u_{rel}(V_1)$ 由 $u_{rel}(V_{100 \mu L})$ 和 $u_{rel}(V_{5000 \mu L})$ 合成:

$$u_{rel}(V_1) = \sqrt{5u_{rel}^2(V_{100 \mu L}) + 5u_{rel}^2(V_{5000 \mu L})} = \sqrt{5 \times 0.01155^2 + 5 \times 0.003464^2} = 0.02696$$

容量瓶产生的相对不确定度 $u_{rel}(V_2)$: 混标储存液及标准溶液的配制过程中用到的玻璃仪器为 1 个 25 mL A 级容量瓶和 6 个 10 mL A 级容量瓶, 其容量允差分别为 ± 0.03 mL 和 ± 0.01 mL, 由于标定值比极限值出现概率高, 容量瓶产生的不确定度统计按三角分布, 取包含因子 $k=\sqrt{6}$, 由容量允差引入的 25 mL 容量瓶及 10 mL 容量瓶的相对不确定度分别为:

$$u_{rel}(V_{25 \text{ mL}}) = 0.03 / (25 \times \sqrt{6}) = 0.004899$$

$$u_{rel}(V_{10 \text{ mL}}) = 0.01 / (10 \times \sqrt{6}) = 0.004825$$

考虑到容量瓶的校准温度为 20 ℃, 实验温控为 (20 ± 4) ℃, 溶剂甲醇的膨胀系数为 0.001 18/℃, 由溶剂体积随温度变化产生的不确定度统计服从均匀分布, $k=\sqrt{3}$, 则引起的相对不确定度为:

$$u_{rel}(T) = (0.00118 \times 4) / \sqrt{3} = 0.002725$$

综合校准与温度因素, 由 25 mL 容量瓶及 10 mL 容量瓶的相对不确定度分别为:

$$u_{rel}(V_{25 \text{ mL}}) = \sqrt{u_{rel}^2(V_{25 \text{ mL}}) + u_{rel}^2(T)} = \sqrt{0.004899^2 + 0.002725^2} = 0.005597$$

$$u_{rel}(V_{10 \text{ mL}}) = \sqrt{u_{rel}^2(V_{10 \text{ mL}}) + u_{rel}^2(T)} = \sqrt{0.004825^2 + 0.002725^2} = 0.005541$$

标准溶液配制过程中容量瓶引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(V_2)$ 由 $u_{\text{rel}}(V_{25 \text{ mL}})$ 和 $u_{\text{rel}}(V_{10 \text{ mL}})$ 合成:

$$u_{\text{rel}}(V_2) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V_{25 \text{ mL}}) + 6u_{\text{rel}}^2(V_{10 \text{ mL}})} = \sqrt{0.005\,597^2 + 6 \times 0.005\,541^2} = 0.014\,68$$

由 (1)、(2)、(3) 计算结果,标准溶液配制过程引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(1) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(S) + u_{\text{rel}}^2(V_1) + u_{\text{rel}}^2(V_2)} = \sqrt{0.003^2 + 0.026\,96^2 + 0.014\,68^2} = 0.030\,84$$

2.2.2 样品配制引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(2)$

根据 1.3 前处理实验步骤,样品配制引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(2)$ 源于电子天平称量产生的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(m)$ 及加入提取溶剂时移液器引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(V_3)$ 。

$$u_{\text{rel}}(2) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(m) + u_{\text{rel}}^2(V_3)}$$

电子天平称量引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(m)$: 电子天平称量引入的不确定度主要来源于示值误差及重复性误差^[1]。使用万分之一电子天平称量 20 mg 毛发样品,根据天平校准证书的结果,当称量范围为 $0 \leq m \leq 50 \text{ g}$ 时,示值误差为 $\pm 0.02 \text{ mg}$,重复性误差为 $\pm 0.02 \text{ mg}$,产生的不确定度统计服从均匀分布,取包含因子 $k = \sqrt{3}$,则样品称量过程中电子天平引入的标准不确定度 $u(m)$ 和相对不确定度 $u_{\text{rel}}(m)$ 分别为:

$$u(m) = \sqrt{u^2(m_1) + u^2(m_2)} = \sqrt{(0.02/\sqrt{3})^2 + (0.02/\sqrt{3})^2} = 0.016\,33 \text{ mg}$$

$$u_{\text{rel}}(m) = u(m)/m = 0.016\,33/20 = 0.000\,816\,5$$

加入提取溶剂时移液器引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(V_3)$: 使用 100~1 000 μL 移液器向装有毛发样品的研磨中加入 1 mL 提取溶液甲醇(或系列标准浓度混标溶液),该规格移液器的容量允差为 $\pm 10 \mu\text{L}$,产生的不确定度统计服从均匀分布,取包含因子 $k = \sqrt{3}$,则:

$$u_{\text{rel}}(V_3) = 10/(1\,000 \times \sqrt{3}) = 0.005\,774$$

由上述计算结果,样品配制引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(2) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(m) + u_{\text{rel}}^2(V_3)} = \sqrt{0.000\,816\,5^2 + 0.005\,774^2} = 0.005\,831$$

2.2.3 线性拟合过程引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(3)$

根据 1.3 制备含量为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 ng/mg 的 6 组标准毛发样品,进行 UPLC-MS/MS 分析,每个样品测定两次。分别以 4 种苯丙胺类兴奋剂定量离子对峰面积对毛发中相应物

质的标准含量作图,并采用最小二乘法进行线性回归分析,各化合物标准曲线方程和线性相关系数见表 2。

表 2 毛发基质中 4 种苯丙胺类兴奋剂的标准曲线回归方程和相关系数

Tab.2 Linear equation and correlation coefficient of four ATSs in hair matrix

化合物	回归方程	相关系数 r
苯丙胺	$y = 1.491\,9 \times 10^7 x - 81\,789.2$	0.998 4
甲基苯丙胺	$y = 2.652\,1 \times 10^7 x + 140\,566.9$	0.999 0
MDA	$y = 5.334\,3 \times 10^6 x + 97\,904.0$	0.996 9
MDMA	$y = 3.021\,7 \times 10^7 x + 340\,826.0$	0.998 7

由表 2 可知,在 0.05~2.0 ng/mg 范围内,4 种苯丙胺类兴奋剂标准曲线方程的相关系数 r 均大于 0.995, y 与 x 线性关系良好。

线性拟合过程中的残差标准差 S 为:

$$S = \sqrt{\sum_{j=1}^n [Y_j - (b \times X_j + a)]^2 / (n - 2)}$$

式中: Y_j 为各物质在每个测定点的定量离子对峰面积; $(bX_j + a)$ 为通过标准曲线方程计算的理论峰面积; $n = 2 \times 6 = 12$, 为标准毛发样品的测定次数。

本实验对 4 种苯丙胺类兴奋剂含量为 0.2 ng/mg 的标准毛发样品测定 6 次,由各物质标准曲线方程求得的平均含量 X_0 作为测定值,则 X_0 的标准不确定度 $u(3)$ 为:

$$u(3) = (S/b) \sqrt{1/p + 1/n + (X_0 - \bar{X})^2 / \sum_{j=1}^n (X_j - \bar{X})^2}$$

式中: b 为标准曲线斜率,取值见表 2; $p = 6$, 为样品测定次数; X_0 为样品中各物质含量的测定值; $\bar{X} = 0.641\,7 \text{ ng/mg}$, 为各标准样品中相应物质含量的平均值; X_j 为各物质在每个测定点的含量值, ng/mL。

线性拟合过程引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(3) = u(3)/X_0$$

表 3 4 种苯丙胺类兴奋剂的回归方程拟合标准偏差、平均浓度($n=6$)、平均浓度标准不确定度和相对不确定度

Tab.3 Standard fitting deviation for regression equation, average concentration ($n=6$), standard uncertainty for average concentration, and relative uncertainty of four ATSs

化合物	S	$X_0 /$ (ng·mg ⁻¹)	$u(3) /$ (ng·mg ⁻¹)	$u_{\text{rel}}(3)$
苯丙胺	458 041	0.215 1	0.016 31	0.075 81
甲基苯丙胺	457 205	0.211 8	0.009 165	0.043 27
MDA	199 505	0.197 7	0.010 65	0.053 88
MDMA	629 008	0.213 4	0.011 09	0.051 97

根据以上公式,4 种苯丙胺类兴奋剂的标准曲线残差标准差 S 、含量平均浓度 X_0 、测定值标准

不确定度 $u(3)$ 及相对不确定度 $u_{\text{rel}}(3)$ 见表 3。

2.2.4 样品处理过程和基质效应引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(4)$ 和 $u_{\text{rel}}(5)$

由于毛发样品的前处理包含研磨、提取、超声等多个步骤,每步均可能导致待测组分损失,不确定度难以量化评估,因此,通过样品提取回收率和基质效应评估该过程产生的相对不确定度。平行配制 6 份各待测苯丙胺类兴奋剂组分含量为 0.2 ng/mg 的标准毛发样品,按 1.3 方法处理后进行 UPLC-MS/MS 分析,根据下列公式计算样品提取回收率及基质效应:

提取回收率(RE) =

标准添加毛发样品经提取后化合物定量离子对峰面积(A) /
空白毛发基质经标准添加后化合物定量离子对峰面积(B) × 100%

基质效应(ME) =

空白毛发基质经标准添加后化合物定量离子对峰面积(B) /
空白溶剂配制湿样品化合物定量离子对峰面积(C) × 100%

由提取回收率和基质效应引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(4)$ 和 $u_{\text{rel}}(5)$ 分别为:

$u_{\text{rel}}(4) = SD_{\text{RE}} / (RE \times \sqrt{n})$

$u_{\text{rel}}(5) = SD_{\text{ME}} / (ME \times \sqrt{n})$

式中: SD_{RE} 为提取回收率标准偏差; SD_{ME} 为基质效应标准偏差; RE 为提取回收率测定平均值; ME 为基质效应测定平均值; $n=6$, 为测定次数。

根据《测量不确定度表示指南》要求^[18],需校正明显系统误差,因此进行了 t 检验^[19](检验公式: $t = | (1-RE) / [RE \times u_{\text{rel}}(4)] |$ 或 $t = | (1-ME) / [ME \times u_{\text{rel}}(5)] |$),考察平均回收率 RE 与基质效应 ME 与 1 之间是否具有统计学差异。若 $t \geq t_{(95,5)} = 2.57$,说明差异具有统计学意义,需用回

表 4 毛发样品中 4 种苯丙胺类兴奋剂的提取回收率、基质效应、对应相对标准不确定度及 t 检验结果

Tab.4 Extraction recovery rate, matrix effect, their respective relative uncertainty and t test result of four ATSs in hair samples

化合物	苯丙胺	甲基苯丙胺	MDA	MDMA
加标含量 / (ng·mg ⁻¹)	0.2	0.2	0.2	0.2
回收率 ($n=6$) / %	107.6±4.9	105.9±2.8	98.9±6.1	106.7±3.5
$u_{\text{rel}}(4)$	0.018 64	0.010 83	0.025 22	0.013 54
t 检验结果	3.79	5.15	0.44	4.64
基质效应 ($n=6$) / %	95.8±3.4	93.3±2.8	97.6±6.0	92.4±4.3
$u_{\text{rel}}(5)$	0.014 35	0.012 13	0.025 03	0.019 00
t 检验结果	3.06	5.92	0.98	4.33

收率校正因子 $f_{\text{RE}}(f_{\text{RE}} = 1/RE)$ 或基质效应校正因子 $f_{\text{ME}}(f_{\text{ME}} = 1/ME)$ 校正测定结果 X_0 , 否则不必校正。毛发中 4 种化合物的提取回收率 RE、基质效应 ME、相对不确定度 $u_{\text{rel}}(4)$ 和 $u_{\text{rel}}(5)$ 及 t 检验结果见表 4。

2.3 合成标准不确定度的计算

在目标物质测定过程中,各不确定度分量相互独立,则合成相对不确定度 $u_{\text{rel}}(X)$ 根据下列公式计算:

$u_{\text{rel}}(X) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(1) + u_{\text{rel}}^2(2) + u_{\text{rel}}^2(3) + u_{\text{rel}}^2(4) + u_{\text{rel}}^2(5)}$

合成标准不确定度为:

$u(X) = u_{\text{rel}}(X) \times X = u_{\text{rel}}(X) \times X_0 \times f_{\text{RE}} \times f_{\text{ME}}$

毛发中 4 种化合物测定的不确定度分量、合成相对不确定度 $u_{\text{rel}}(X)$ 及合成标准不确定度 $u(X)$ 见表 5。

表 5 4 种苯丙胺类兴奋剂测定的不确定度分量、合成相对不确定度及合成标准不确定度

Tab.5 Each source of uncertainty, combined relative uncertainty and standard uncertainty for determinations of four ATSs

化合物	苯丙胺	甲基苯丙胺	MDA	MDMA
$u_{\text{rel}}(1)$	0.030 84	0.030 84	0.030 84	0.030 84
$u_{\text{rel}}(2)$	0.005 831	0.005 831	0.005 831	0.005 831
$u_{\text{rel}}(3)$	0.075 81	0.043 27	0.053 88	0.051 97
$u_{\text{rel}}(4)$	0.018 64	0.010 83	0.025 22	0.013 54
$u_{\text{rel}}(5)$	0.014 35	0.012 13	0.025 03	0.019 00
$u_{\text{rel}}(X)$	0.085 36	0.055 87	0.071 77	0.065 04
$u(X) / (\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1})$	0.017 81	0.011 98	0.014 19	0.014 08

2.4 扩展不确定度的计算及结果报告

各化合物扩展不确定度 U 根据如下公式计算:

$U = k \times u(X)$

在 95% 置信水平下,取扩展因子 $k=2$,毛发样品中 4 种苯丙胺类兴奋剂(0.2 ng/mg) 的扩展不确定度及结果报告见表 6。

表 6 毛发中 4 种苯丙胺类兴奋剂测定的扩展不确定度和结果报告

Tab.6 Expanded uncertainty and result report of four ATSs in hair

化合物	$U / (\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1})$	结果报告 / ($\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$)
苯丙胺	0.035 6	0.208 7±0.035 6
甲基苯丙胺	0.024 0	0.214 4±0.024 0
MDA	0.028 4	0.197 7±0.028 4
MDMA	0.028 2	0.216 5±0.028 2

根据各不确定度分量的评定结果,线性拟合引入的不确定度分量最大,主要源于拟合过程中

各标准浓度点的残差标准差。因此,在检测范围内,可通过增加标准含量样品点的个数及精简标准溶液配制流程等措施减小不确定度的引入,提高测定结果准确度。

3 结论

测量结果的不确定度直接决定了定量结果准确度及实用价值,对量值溯源、实验方法优化、检测质量提升等意义重大。本工作建立了 UPLC-MS/MS 外标法测定毛发中苯丙胺类兴奋剂含量,并从标准溶液配制、样品配制、线性拟合、样品处理过程及基质效应等方面,分析不确定度来源,进行量化评定、合成与扩展。当毛发中 4 种苯丙胺类兴奋剂含量在阈值(0.2 ng/mg)附近时,扩展不确定度为 0.024 0~0.035 6 ng/mg。本文可用于 UPLC-MS/MS 法测定毛发中苯丙胺类兴奋剂含量的不确定度评估,在实验条件不变的前提下,通过测定未知样品时对相应不确定度分量的修改,可迅速获得相应组分定量分析结果的扩展不确定度信息。本文特别给出了毛发样品中苯丙胺类兴奋剂含量在吸毒成瘾认定阈值(0.2 ng/mg)处完整的不确定度评估报告,对吸毒成瘾认定及法医鉴定领域风险防控具有重要意义。

参考文献:

- [1] 石晶晶,吴宁,李锦.苯丙胺类兴奋剂成瘾的治疗药物研究现状[J].中国药物依赖性杂志,2016,25(2):145-150.
- [2] 国家禁毒委员会办公室.2019 年中国毒品形势报告[M].北京:公安部禁毒局,2020.
- [3] SCHWELM H M,GRUMANN C,AUWATER V,et al.Application of a chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 13 related amphetamine-type stimulants to forensic samples: Interpretative hypotheses[J].Drug Test. Anal., 2020,12(9):1354-1365.
- [4] CREVELIN E J,SALAMI F H,ALVES M N R,et al.Direct analysis of amphetamine stimulants in a whole urine sample by atmospheric solids analysis probe tandem mass spectrometry[J].J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2016,27(5):944-947.
- [5] ZESTOS A G,MIKELMAN S R,KENNEDY R T,et al. PKC β inhibitors attenuate amphetamine-stimulated dopamine efflux[J].ACS Chem. Neurosci., 2016,7(6):757-766.
- [6] 孙浩波,刘倩蕊,陈乌桥,等.生物检材中甲基苯丙胺分析方法研究进展[J].中国法医学杂志,2019,34(1):67-70.
- [7] BHATT M,ZIELINSKI L,BAKER-BEAL L,et al.Efficacy and safety of psychostimulants for amphetamine and methamphetamine use disorders: A systematic review and meta-analysis[J].Syst. Rev., 2016,5(1):189.
- [8] 公安部.涉毒人员毛发样本检测规范:公禁毒[2018]938 号[S].北京:公安部禁毒局,2018.
- [9] LI J K,LI Y,CHEN M C,et al.Uncertainty evaluation for the determination of repaglinide in human plasma by LC-MS/MS[J].Accreditation Qual. Assur., 2013,18(1):61-70.
- [10] BRIEUDES V,LARDY-FONTAN S,LALERE B,et al.Validation and uncertainties evaluation of an isotope dilution-SPE-LC-MS/MS for the quantification of drug residues in surface waters[J].Talanta, 2016,146(1):138-147.
- [11] 万浩芳,应佳妮.高效液相色谱法测定款冬花中款冬酮含量的不确定度评估[J].化学试剂, 2020,42(11):1327-1330.
- [12] 司法部.毛发中 15 种毒品及其代谢物的液相色谱-串联质谱检验方法:SF/Z JD0107025—2018[S].上海:司法部公共法律服务管理局,2018.
- [13] 侯伟,张蕾萍,王继芬,等.人体毛发中常见毒品及其代谢物的超高效液相色谱串联质谱法检验和统计分析[J].分析试验室,2020,39(11):1264-1270.
- [14] WANG X,CUI J J,ZHUO Y,et al.A retrospective of prevalence of drugs of abuse by hair analysis in Shanghai using LC-MS/MS[J].J. Anal. Toxicol., 2020,44(5):482-489.
- [15] LENDOIRO E,JIMENEZ-MORIGOSA C,CRUZ A,et al.An LC-MS/MS methodological approach to the analysis of hair for amphetamine-type-stimulant (ATS) drugs,including selected synthetic cathinones and piperazines[J].Drug Test. Anal., 2017,9(1):96-105.
- [16] 国家质量监督检验检疫总局.测量不确定度评定与表示:JJF1059.1—2012[S].北京:中国标准出版社,2012.
- [17] 黎小兰,黄成安,潘拾朝,等.高效液相色谱法测定保健品益生菌粉中三氯蔗糖的不确定度评估[J].食品安全质量检测学报,2020,11(23):8730-8735.
- [18] 杨先麟,戴克中.测量不确定度与《测量不确定度表示指南》[J].武汉化工学院学报,2002,24(1):74-78.
- [19] 王邱,刘德群,周铭林,等.高效液相色谱法对食品中苯并芘含量测定的不确定度评定[J].粮油食品科技,2021,29(1):173-179.