



Original Article

Determination of Amphetamine and Methamphetamine in Human Hair by Gas Chromatography Mass Spectrometry

Pham Quoc Chinh¹, Pham Thi Thu Ha¹, Nguyen Mai Dung¹, Vu Huu Phuoc²,
Vu Duc Loi², Nguyen Tien Vung^{1,*}

¹National Institute of Forensic Medicine, 41 Nguyen Dinh Chieu, Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam

²VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Received 12 May 2020

Revised 19 May 2020; Accepted 13 August 2020

Abstract: This article develops a combined solid phase extraction (SPE) and gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) procedure for determining amphetamine-type stimulants Amphetamine (AM) and Methamphetamine (MA) in human hair. Hair samples were incubated in methanol containing 1% hydrochloric acid in 18 hours and then subjected to SPE. The obtained extracts were evaporated to dryness, derivatized with heptafluorobutyric anhydride (HFBA) at 70 °C for 30 minutes prior to GC-MS analysis. Gas chromatography mass spectrometry was run on HP5-MS column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) with detector MS 5975C. Experimentally, the proposed method proved sensitive, simple and time-saving, but quite accurate with a low limit of detection (LOD = 0.05ng/mg) and quantitation (LOQ = 0.15ng/mg).

Keywords: SPE, GC – MS, hair samples, amphetamine, methamphetamine.

* Corresponding author.

E-mail address: tienvung@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4240>

Xác định Amphetamin và Methamphetamin trong tóc bằng sắc ký khí khối phổ

Phạm Quốc Chinh¹, Phạm Thị Thu Hà¹, Nguyễn Mai Dung¹, Vũ Hữu Phước², Vũ Đức Lợi², Nguyễn Tiến Vững^{1,*}

¹*Viện Pháp y Quốc gia, 41 Nguyễn Đình Chiểu, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam*

²*Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 12 tháng 5 năm 2020

Chỉnh sửa ngày 19 tháng 5 năm 2020; Chấp nhận đăng ngày 13 tháng 8 năm 2020

Tóm tắt: Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp xác định Amphetamin (AM), Methamphetamin (MA) trong tóc bằng sắc ký khí khối phổ. Xử lý mẫu bằng ngâm tóc trong methanol có chứa 1% acid hydrochloric, kết hợp với chiết pha rắn. Chất phân tích được dẫn xuất với HFBA ở 80 °C để tăng độ nhạy. Phương pháp có độ tin cậy cao và khả năng phát hiện được AM, MA trong tóc với một lượng rất nhỏ là 0,06ng đối với AM và 0,08 ng đối với MA trong 1 mg tóc.

Từ khóa: GC-MS, tóc, AM, MA, chiết pha rắn.

1. Mở đầu

Amphetamin (AM) và Methamphetamin (MA) là chất kích thích thần kinh dạng amphetamin (ATS) hiện được sử dụng bất hợp pháp trên thế giới trong đó có Việt Nam và gây ra nhiều hệ lụy trong xã hội. Để thực hiện tốt công tác phòng chống các hành vi bất hợp pháp liên quan tới loại ma túy trên, công việc kiểm nghiệm và phát hiện ATS đóng một vai trò không hề nhỏ. Sự kết hợp của phương pháp phân tích hiện đại sử dụng sắc ký khí khối phổ (GC-MS), sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS) với phương pháp chiết pha rắn (SPE) hay chiết lỏng – lỏng đối với các mẫu pháp y như nước tiểu [1,2]; tóc [3,4] đã thu hút được nhiều sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới và đã được ứng dụng thành công.

Tại Việt Nam, một số cơ quan giám định cũng đã bắt đầu nghiên cứu, xác định ma túy trong dịch sinh học, mở ra một hướng mới cho

việc phân tích các chất gây nghiện, trong đó việc phân tích ATS trong nước tiểu sử dụng phương pháp vi chiết pha rắn kết hợp với GC-MS hoặc SPE kết hợp với GC-MS [5] được chú trọng nhiều. Tuy nhiên, việc phân tích ma túy trong tóc chưa được nghiên cứu. Đặc biệt giám định ma túy trong tóc đối với pháp y có ý nghĩa rất quan trọng để xác định đối tượng sử dụng ma túy trước đó đã lâu hoặc trong trường hợp nạn nhân tử vong. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng quy trình xác định ma túy tổng hợp AM và MA trong tóc bằng GC-MS phục vụ công tác phòng chống tệ nạn ma túy và giám định pháp y tại Việt Nam.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Hóa chất, thuốc thử:

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: tienvung@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4240>

- Chất chuẩn Amphetamin 1mg/ml methanol, mã A-007, Lot: FE050614-06(Mỹ).

- Chất chuẩn Methamphetamin 1mg/ml methanol, mã M-009, Lot: FE01710-02 (Mỹ).

- Chất chuẩnmethamphetamin-d5 (MA-d5) 1mg/ml methanol, mã M-023, Lot: FE042012-02 (Mỹ), được sử dụng làm nội chuẩn.

Methanol và ethylacetatloại HPLC; anhydrid heptafluorobutyric (HFBA), kalihydrophosphat, kalidihydrophosphat và amoniacloại PA đều của Merck, Đức.

Thiết bị:máy sắc ký khí khối phổ Agilent Technologies 6980N, detector MS 5975C.Hệ thống chiết pha rắn Agilent sử dụng cột Evidex Cartridges, 200 mg, 3 ml (Mỹ).

Mẫu nghiên cứu:mẫu tóc không nhiễm ma túy (mẫu trắng) và mẫutóc của người nghi ngờ sử dụng ma túy gửi đến giám định tại Viện Pháp y Quốc gia từ tháng 7 đến tháng 9 năm 2019.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Điều kiện sắc ký:Cột sắc kí HP5-MS: (30m × 250 μm × 0,25 μm). Chương trình nhiệt độ cột: Bắt đầu 80°C, giữ 3 phút, tăng lên 40°C/phút đến 200°C và giữ 1 phút, tiếp tục tăng 10°C/ phút đến 290°C và giữ trong 10 phút.Khí mang: Heli, tốc độ dòng 1 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu: 1 μl, chế độ không chia dòng.

Điều kiện MS: nhiệt độ nguồn ion hóa MS 230°C; nhiệt độ khối tử cực MS 150°C; nhiệt độ đường dẫn kết nối GC và MS 280°C. Nguồn ion hóa bằng va chạm điện tử (Electron impact, EI) với năng lượng 70eV.

2.3. Chuẩn bị mẫu

Mẫu chuẩn: các dung dịch chuẩn AM và MA nồng độ 1mg/ml pha thành các dung dịch có nồng độ0,1 μg/ml và1 μg/ml trong methanol. Chuẩn nội MA-d5 nồng độ 1 μg/ml trong methanol.

Mẫu trắng thêm chuẩn: sử dụng mẫu tóc trắng thêm chuẩn để được các mẫu có hàm lượng 0,5 - 50 ng/mg, và chuẩn nội MA-d5 10 ng/mg.

Mẫu thử: mẫu thử được thêm nội chuẩn để có hàm lượng 10 ng/mg.

Xử lý mẫu: cân chính xác khoảng 10 mg tóc vào mỗi ống nghiệm. Rửa theo thứ tự bằng nước cất 3 lần, mỗi lần 5 ml rồi bằng methanol 3 lần mỗi lần 5 ml. Tóc sau đó được cắt khoảng 1mm. Thêm 2 ml dung dịch acid hydrocloric 1%/methanol, thêm nội chuẩn và ủ khoảng 18 giờ ở nhiệt độ phòng. Mẫu được ly tâm lấy dịch. Dịch thu được sẽ được làm khô bằng khí nitơ tới cạn.[3]. Cẩn được hòa tan bằng 3 ml dung dịch đệm phosphat 0,1M; pH 6 rồi tiến hành chiết pha rắn. Hoạt hóa cột lần lượt bằng methanol và dung dịch đệm phosphat 0,1M; pH 6 mỗi loại 3 ml tốc độ 2 ml/phút. Nạp mẫu vào cột với tốc độ 2 ml/phút. Rửa cột với 10 ml nước cất và 5 ml dung dịch acid hydrocloric 0,1N tốc độ 5 ml/phút. Tiếp tục, rửa cột bằng 5 ml methanol tốc độ 2 ml/phút. Hút khô cột 1 phút. Rửa giải bằng 5 ml hỗn hợp ethyl acetat : methanol : amoniac (80:18:2) tốc độ 2 ml/phút. Dịch rửa giải được làm khô dưới dòng khí nitơ tới cạn [1]. Thêm vào cẩn 100 μl ethyl acetat và 100 μl HFBA. Ủ ở 80 °C/30 phút. Để nguội, làm khô và hòa cẩn bằng 100 μl methanol.

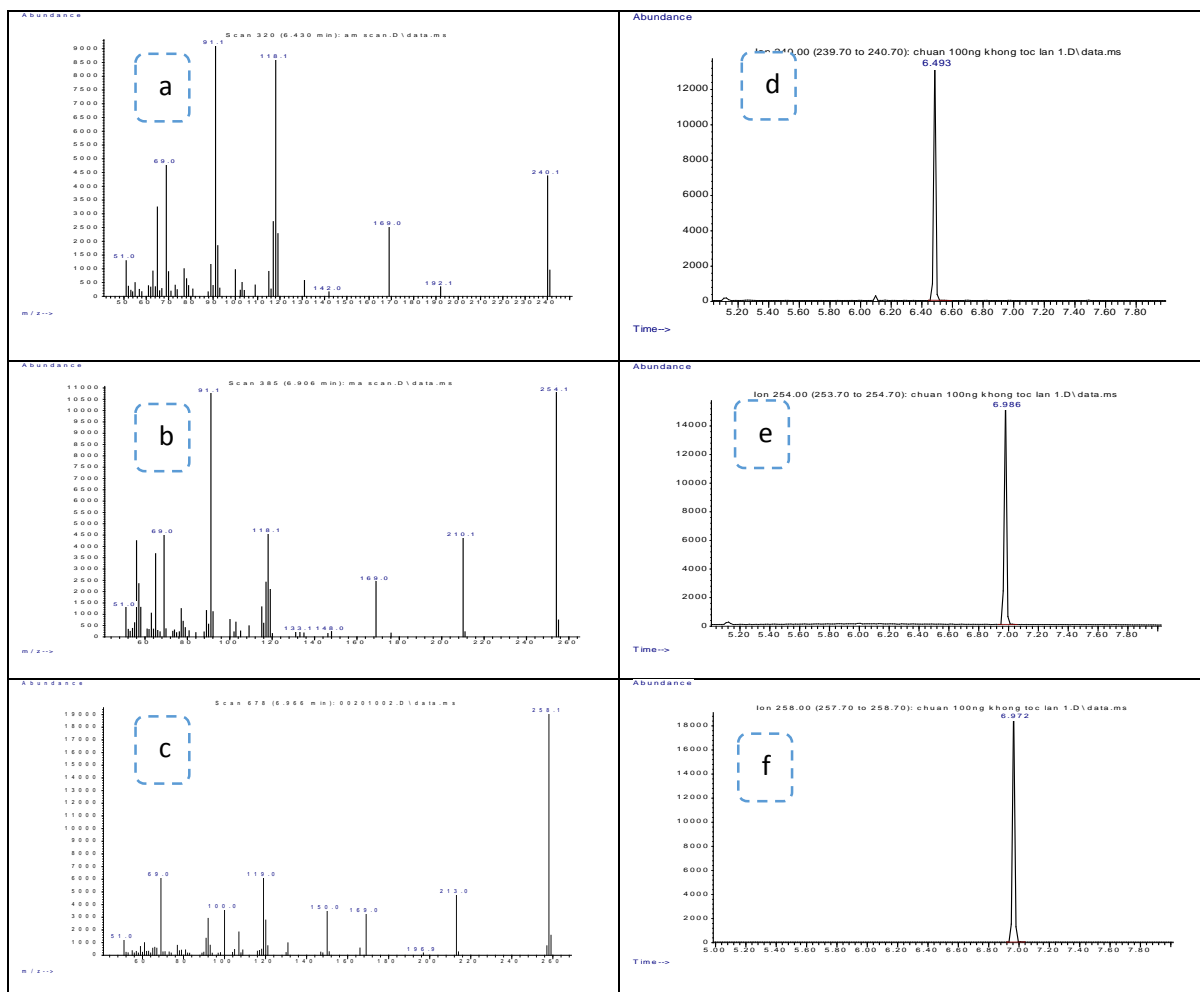
2.4. Xử lý số liệu

Các đặc trưng thống kê được tính dựa vào công thức hoặc dựa vào các hàm số trong phần mềm Microsoft Excel 2003.Hàm lượng AM và MA trong mẫu tóc được tính dựa vào đường chuẩn xây dựng trong cùng ngày phân tích với $r \geq 0,99$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả

Khảo sát phổ khối của AM, MA và MA-d5
Phổ khối của AM, MA và MA-d5 tạo dẫn xuất với HFBA rõ ràng, riêng biệt. Dựa vào tính đặc trưng và mức tín hiệu, chọn các mảnh $m/z = 240$ cho AM, $m/z = 254$ cho MA và $m/z = 258$ cho MA-d5 để tiến hành phân tích sắc ký theo chế độ SIM (Hình 1).



Hình 1. Phổ khối và sắc ký đồ của AM, MA, MA-d5 dẫn xuất HFBA.

a) Phổ khối của AM-HFBA; b) Phổ khối của MA-HFBA; c) Phổ khối của MA-d5-HFBA; d) Sắc ký đồ của AM-HFBA ($m/z = 240$); e) Sắc ký đồ của MA-HFBA ($m/z = 254$); f) Sắc ký đồ của MA-d5-HFBA ($m/z = 258$).

Thẩm định phương pháp

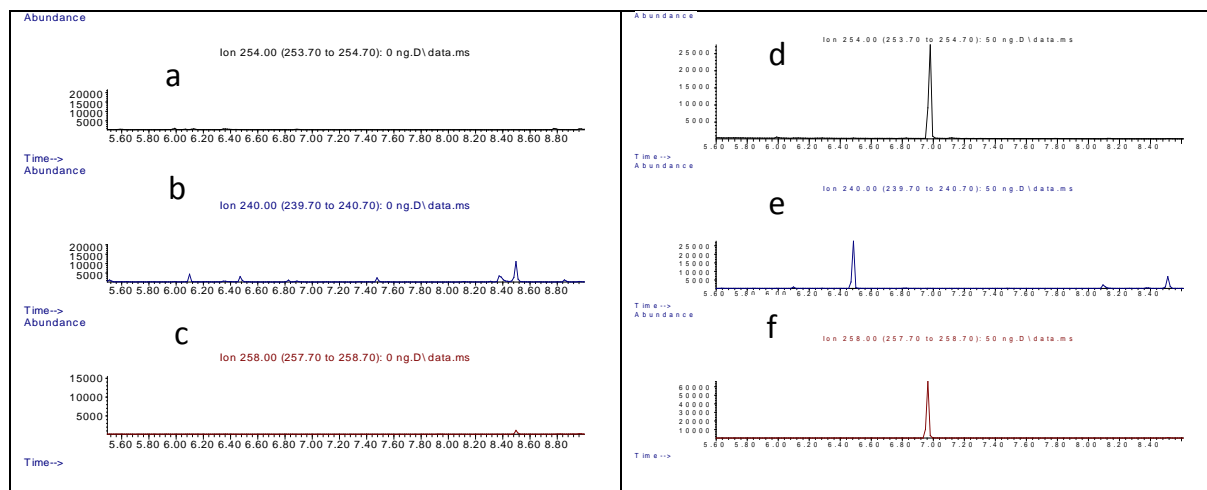
Độ thích hợp của hệ thống

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn AM và MA nồng độ 100 ng/ml. Ghi lại giá trị thời gian lưu và diện tích pic. Kết quả thời gian lưu của AM khoảng 6,49 phút và của MA khoảng 6,98 phút; RSD của thời gian lưu của AM và MA lần lượt là 0,22% và 0,25%. RSD của diện tích pic của AM và MA lần lượt là 1,71 % và 1,66 %. Điều này cho thấy thời gian lưu và diện tích pic đều có RSD < 2%, thời gian lưu của các chất giữa các lần phân tích không có sự khác biệt nhiều. Vậy hệ thống sắc ký ổn định, đảm bảo chính xác để phân tích mẫu cho kết quả tin cậy.

Độ đặc hiệu

Chuẩn bị 6 mẫu tóc trắng, 6 mẫu tóc trắng thêm chuẩn và nội chuẩn ở hàm lượng 10 ng/mg. Xử lý mẫu và tiến hành sắc ký. Kết quả được trình bày ở Hình 2.

Kết quả ở Hình 2 cho thấy trên sắc đồ mẫu trắng, tại thời gian lưu của AM, MA và MA-d5 không thấy xuất hiện pic. Sắc đồ của mẫu trắng thêm AM, MA và MA-d5 có các pic xuất hiện ở khoảng 6,5 phút và 7,0 phút ứng với giá trị trên sắc đồ của chất chuẩn AM, MA và MA-d5 đã khảo sát. Kết quả xác nhận phương pháp đảm bảo tính đặc hiệu.



Hình 2. Sắc ký đồ của a) mẫu tóc trắng (m/z = 254); b) mẫu tóc trắng (m/z = 240); c) mẫu tóc trắng (m/z = 258); d) mẫu tóc trắng thêm chuẩn MA (m/z= 254) e) mẫu tóc trắng thêm chuẩn AM (m/z= 240) và f) mẫu tóc trắng thêm chuẩn MA-d5 (m/z = 258).

Bảng 1. Kết quả thẩm định phương pháp

Khoảng tuyến tính	Chất phân tích	Hàm lượng (ng/mg)	Đường chuẩn	Hệ số tương quan	
	AM	0,5-50	$y = 0,0783x + 0,0642$	0,9991	
MA	0,5-50	$y = 0,0902x + 0,0816$	0,9994		
Độ đúng và độ lặp lại (n=5)	Chất phân tích	Lượng thêm (ng/mg)	Độ thu hồi (%)	RSD (%)	
	AM	0,5	106,29	3,35	
		10	98,36	3,88	
		50	97,13	4,11	
	MA	0,5	97,88	3,18	
		10	102,98	3,73	
50		98,53	2,75		
LOD và LOQ (ng/mg)	Chất phân tích	LOD	LOQ		
	AM	0,08	0,24		
	MA	0,06	0,18		
Hiệu suất chiết (n=5)	Chất phân tích	Hàm lượng 1 ng/mg		Hàm lượng 10 ng/mg	
	AM	R(%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)
		89,01	3,65	90,85	3,88
	MA	R(%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)
		89,24	4,17	88,42	3,73

Khoảng tuyến tính

Xây dựng đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa hàm lượng AM, MA và tỉ lệ diện tích pic của AM/MA-d5 và MA/MA-d5. Chuẩn 0,5 ng/mg, 1 ng, 5 ng/mg, 10 ng/mg, 20 ng/mg và 50 ng/mg.

Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp

Để khảo sát độ đúng và độ lặp lại, tiến hành đánh giá ở 3 mức hàm lượng của AM, MA là 0,5 ng/mg, 10 ng/mg và 50 ng/mg. Mỗi mức hàm lượng tiến hành lặp lại 5 lần. Xác định hàm lượng AM, MA trong mẫu thử bằng phương pháp

đường chuẩn và tỉ lệ % giữa lượng xác định được so với lý thuyết.

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

LOD và LOQ của phương pháp phân tích AM, MA trong tóc được khảo sát bằng phân tích các mẫu AM, MA ở các hàm lượng giảm dần theo quy trình xử lý mẫu. Căn chiết được tạo dẫn xuất với HFBA rồi tiến hành sắc ký. So sánh tín hiệu chiều cao pic AM, MA với nhiều đường nền ở các hàm lượng đó.

Hiệu suất chiết

Đánh giá hiệu suất chiết đối với AM, MA ở hàm lượng 1 ng/mg và 10 ng/mg tóc. Chuẩn bị mẫu chuẩn AM, MA ở các hàm lượng đã nêu, tiến hành chiết và tạo dẫn xuất, sử dụng dung dịch chuẩn thay vì mẫu thử. Hiệu suất chiết được tính bằng tỷ lệ phần trăm diện tích pic của chuẩn cùng hàm lượng giữa chuẩn được chiết và không chiết.

Các kết quả thẩm định phương pháp được trình bày ở Bảng 1.

3.2. Bàn luận

Xử lý mẫu có vai trò đặc biệt quan trọng trong phân tích, đặc biệt là đối với mẫu thử sinh học. Quá trình rửa mẫu tóc bằng nước và methanol với mục đích loại bụi, bã, dầu mỡ... tạo cho mẫu sạch và ít cản trở đến quá trình phân tích. Quy trình phân tích đã dùng sử dụng phương pháp ngâm tóc trong dung dịch acid hydrochloric 1%/methanol ở nhiệt độ phòng, quá trình này chiết được AM, MA dưới dạng muối do vậy ít ảnh hưởng đến sự phân hủy mẫu và bay hơi mẫu. Chiết pha rắn được thực hiện trên cột chiết Evidex là cột kết hợp giữa pha đảo C18 và trao đổi cation, thích hợp cho chiết các chất ma túy trong dịch sinh học. Quy trình chiết pha rắn được thực hiện tiện lợi, có thể làm nhiều mẫu cùng lúc. Quy trình phân tích sử dụng HFBA để tạo dẫn xuất với nhóm amin trong AM, MA tạo thành amid làm tăng khả năng bay hơi của chất phân tích, tăng độ nhạy [6].

Điều kiện sắc ký sử dụng cột HP5-MS là cột có độ phân cực trung bình, phổ biến trong phân tích độc chất. Chương trình nhiệt độ bắt đầu từ 80°C và kết thúc ở 290°C. Với chương trình này,

sắc ký đồ của AM, MA và MA-d5 cho pic rõ ràng, nhọn, sắc nét và thời gian phân tích ngắn hơn so với kết quả của tác giả Dong-liang Lin [3]. Tác giả Dong-liang Lin sử dụng cột HP1-MS và chương trình nhiệt độ bắt đầu từ 60°C và kết thúc ở 300°C.

Phương pháp GC-MS trong phân tích độc chất có độ nhạy và chính xác cao. Qua kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống tại thời gian lưu và diện tích pic cho thấy các thông số RSD < 2 %, chứng tỏ hệ thống có tính phù hợp, có thể ứng dụng trong mẫu phân tích thực tế. Phương pháp có tính chọn lọc, độ đặc hiệu cao, cho thấy sự xuất hiện rõ rệt các pic của AM, MA, MA-d5. Thẩm định phương pháp cho thấy độ đúng là 97,13 % - 106,29 %. Quy trình phân tích thực hiện cho kết quả về giới hạn định tính và giới hạn định lượng của AM là 0,06 ng/mg và 0,18 ng; của MA lần lượt là 0,08 ng và 0,24 ng trong 1 mg tóc. Phương pháp đáp ứng được yêu cầu phân tích lượng vết AM, MA trong tóc [7]. Tác giả María Jesús Taberero và cộng sự [8] sử dụng LC-MS/MS để xác định AM và ketamin trong tóc với giới hạn phát hiện từ 0,1 ng/mg đến 0,5 ng/mg. Điều này cho thấy phương pháp GC-MS phân tích ma túy trong tóc có độ nhạy tương đương so với LC-MS/MS.

Phương pháp đã được áp dụng phân tích mẫu thực. Kết quả phân tích 5 mẫu cho thấy có 3 mẫu dương tính với AM, MA và 2 mẫu âm tính với AM, MA. Điều này chứng tỏ quy trình phân tích là phù hợp trong giám định AM, MA trong tóc. Trong nước chưa có công bố nào về phân tích AM, MA trong tóc. Tuy nhiên ở nước ngoài, việc phân tích các mẫu tóc cho thấy tỉ lệ AM, MA dương tính khá nhiều [3]. Việc phát hiện được lượng vết AM, MA trong mẫu thực đưa ra gợi ý tóc là mẫu được lựa chọn tối ưu đối với trường hợp không thể lấy được dịch sinh học như máu và nước tiểu.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp xác định AM, MA trong tóc bằng sắc ký khí khối phổ, xử lý mẫu bằng ngâm tóc trong methanol có chứa 1% acid hydrochloric, kết hợp với chiết pha

rắn. Chất phân tích được dẫn xuất với HFBA ở 80 °C để tăng độ nhạy. Phương pháp có độ tin cậy cao và khả năng phát hiện được AM, MA trong tóc với một lượng rất nhỏ là 0,06ng đối với AM và 0,08 ng đối với MA trong 1 mg tóc. Đã phân tích 05 mẫu thực tế, trong đó có 3 mẫu dương tính với cả AM và MA.

Kết quả cho thấy phương pháp đã xây dựng phù hợp cho nghiên cứu xác định AM, MA trong tóc, làm cơ sở để áp dụng cho các phòng giám định ma túy và phục vụ cho chuyên ngành pháp y trên toàn quốc.

Tài liệu tham khảo

- [1] Ming-Ren Fuh, Ti-Yu Wu and Tzuen-Yeuan Lin, Determination of amphetamine and methamphetamine in urine by solid phase extraction and ion-pair liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry *Talanta*, 68 (3) (2006), 987-991. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.057>
- [2] Naresh C. Jain, Thomas C. Sneath, and Robert D. Budd, Rapid Gas-Chromatographic Determination of Amphetamine and Methamphetamine in urine, *Clinical Chemistry*, 20 (11) (1974) 1460-1462. <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.11.1460>.
- [3] Dong-liang Lin, Rea-Ming Yin, Ray H. Liu, Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis of Amphetamine, Methamphetamine, 3,4-Methylenedioxy- amphetamine and 3,4-Methylenedioxymethamphetamine in Human Hair and Hair Sections, *Journal of Food and Drug Analysis*, 13(2) (2005) 193-200. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2526>
- [4] María Jesús Tabernero, Maria Linda Felli, Ana María Bermejo, Marcello Chiarotti, Determination of ketamine and amphetamines in hair by LC/MS/MS, *Anal Bioanal Chem*, 395(2009), 2547–2557. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3163-4>.
- [5] D.V. Doan, D.Q. Huy, N.D. Hue, T.M. Tri, Determination of methamphetamine in urine samples by gas chromatography mass spectrometry combined with solid phase extraction technique, *Journal of Science and Technology* 47 (6) (2009) 53-58 (in Vietnamese).
- [6] Rodger L. Foltz, Allison F. Fentiman, Ruth B. Foltz, *GC/MS Assays for Abused Drugs in Body Fluids*, National Institute on Drug Abuse, Maryland, 1980.
- [7] AOAC, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, AOAC official methods of analysis, Maryland, 2016.
- [8] Eunyoung Han, Martin P. Paulus, Marc Wittmann, Heesun Chung, Joon myong Song, Hair analysis and self-report of methamphetamine use by methamphetamine dependent individuals, *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.01.002>.