

SPME-HPLC-MS 同时检测尿液中氯胺酮与 MDMA 及其体内主要代谢物

刘红¹, 李华云², 龚冶³, 孙琴^{1,4*}, 代勇^{3**}⁽¹⁾西南医科大学药学院; ⁽²⁾西南医科大学附属医院药学部; ⁽³⁾四川警察学院刑事科学技术系;⁽⁴⁾西南医科大学附属中医医院中西医结合药物研究中心, 泸州 646000

摘要 建立尿液中氯胺酮和 3,4-亚甲二氧基甲基苯丙胺 (MDMA) 及其主要代谢物去甲氯胺酮和 3,4-亚甲二氧基苯丙胺 (MDA) 固相微萃取-液相色谱-质谱联用的含量测定方法。在添加定量氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA 和 MDA 对照品的尿液试样中, 调节 pH 11, 加入固体 Na_2CO_3 , 60 °C 下加热搅拌, 用 60 μm 聚二甲基硅烷-二乙烯基苯 (PDMS/DVB) 共聚物萃取头萃取 15 min, HPLC-MS 检测。在 0.03 ~ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 相关系数 $r \geq 0.9992$, 最小检测限为 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 平均回收率均在 97.19% ~ 105.44% 之间, RSD 均在 10% 以内。该方法操作简单、安全性高、结果准确, 可用于测定尿液中氯胺酮与 MDMA 及其体内主要代谢物。

关键词 氯胺酮; MDMA; 去甲氯胺酮; MDA; 固相微萃取; 液质联用; 尿液

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2019)02-0188-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190209

引用本文 刘红, 李华云, 龚冶, 等. SPME-HPLC-MS 同时检测尿液中氯胺酮与 MDMA 及其体内主要代谢物[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(2):188-192.

Cite this article as: LIU Hong, LI Hua-yun, GONG Ye, *et al.* Detection of ketamine, MDMA and their main metabolites in urine samples by SPME-HPLC-MS[J]. *J China Pharm Univ*, 2019, 50(2):188-192.

Detection of ketamine, MDMA and their main metabolites in urine samples by SPME-HPLC-MS

LIU Hong¹, LI Huayun², GONG Ye³, SUN Qin^{1,4*}, DAI Yong^{3**}¹School of Pharmacy Southwest Medical University; ²Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Southwest Medical University;³Department of Criminal Science and Technology, Sichuan Police College; ⁴Drug Research Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated Chinese Medicine Hospital of the Southwest Medical University, Sichuan Police College, Luzhou 646000, China

Abstract To establish a method for the determination of ketamine and MDA and their main metabolites in urine by solid phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry. In a urine sample supplemented with quantitative ketamine, norketamine, MDMA and MDA control. The solution was adjusted pH 11, added solid Na_2CO_3 , heated and stirred at 60 °C. Then, the sample was extracted by SPME with 60 μm polydimethylsiloxane-vinylbenzene copolymer (PDMS/DVB), a middle-polar coated fiber for 15 minutes and then analyzed by HPLC-MS. The result showed good linearity in the range of 0.03-1.0 $\mu\text{g/mL}$, $r \geq 0.9992$, and LOD was 0.01 $\mu\text{g/mL}$, the value of the average recovery rate was varying from 97.19% - 105.44%, and RSD was within 10%. The method is simple, safe and accurate, and can be used to determine ketamine, MDMA and their main metabolites in urine.

Key words ketamine; MDMA; norketamine; MDA; SPME; HPLC-MS; urine

This study was supported by the Program of Department of Science and Technology of Sichuan Province (No. 2015JY0028)

收稿日期 2018-10-09 通信作者 * Tel:18982412916 E-mail:sdy-0502@126.com

** Tel:18989127137 E-mail:sdy-0502@163.com

基金项目 四川省科技厅资助项目 (No. 2015JY0028)

“摇头丸”(3,4-亚甲二氧基甲基苯丙胺为主要成分)和“K 粉”(氯胺酮)是吸毒人员经常混合吸食毒品,目前对混合毒品检测的报道主要集中在对原料药和缴获毒品的分析测定方面^[1],对生物检材中毒品的检测大多针对单一毒品及其代谢物,其前处理通常采用液相萃取或固相萃取等方式^[2]。近年来,固相微萃取作为一种快速便捷的提取方式,已广泛用于生物样品的前处理。在公安机关打击毒品犯罪的实际工作中,尿液因其易于采集、无损害且能反映毒品在体内代谢情况,已作为一种重要的生物物证,成为公安机关判断吸毒嫌疑人是否吸食毒品的首选检材^[3]。目前,对混合毒品的检测大多采用气质联用技术进行检测,对实验条件有一定的要求。本研究采用固相微萃取-液相色谱-质谱联用技术,为此类混合毒品及其代谢产物的检测提供新的检测方法。

本研究以尿液中的氯胺酮与 3,4-亚甲二氧基甲基苯丙胺(MDMA)及其主要代谢物去甲氯胺酮、3,4-亚甲二氧基苯丙胺(MDA)为检测对象,以固相微萃取作为样品前处理手段,并考察了其萃取条件,确定了 HPLC-MS 对尿液中氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA 和 MDA 的检测方法,希望为公安机关提供较为便捷、准确的生物检材中混合毒品的鉴别方法,同时也为其他混合毒品及其体内代谢物的分析与检测提供参考与借鉴。

1 实验部分

1.1 仪器及测试条件

仪器:Agilent-1200 Series 液相色谱仪,配 G6130A 质谱仪(美国 Agilent 公司);色谱柱为键合 EC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm; 美国 Agilent 公司)。萃取头:85 μm 聚丙烯(PA)、100 μm 聚二甲基硅氧烷(PDMS)、60 μm 聚二甲基硅烷-二乙烯基苯共聚物萃取头(PDMS/DVB)、SPME 进样器、CORNING 固相微萃取采样台(美国 Supelco 公司);GPA224S 万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司);KH3200E 型超声清洗仪(上海声源超声波仪器设备有限公司)。

色谱条件:采用 EC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm)色谱柱,以 0.1% 甲酸水(A)-甲醇(B)作为流动相,梯度洗脱:0 ~ 6 min, 70% A → 30% A, 6 ~ 7 min, 30% A → 10% A, 保持 3 min。流速

0.2 mL/min,进样量 1 μL,柱温 40 ℃。

质谱条件:采用电喷雾电离源正离子扫描(ESI⁺),SIM 监测模式;干燥气(N₂)流速:10 L/min,干燥器温度:350 ℃,雾化电压 3 kV,数据采集 0 ~ 10 min,待检测物的 SIM 监测离子和碰撞能见表 1。

Table 1 SIM of analyte monitor ions and collision energy

Drug	Parent ions/ (<i>m/z</i>)	Product ions/ (<i>m/z</i>)	Collision energy/eV
Ketamine	238.1	179 *	18
Norketamine	224.1	207 *	15
MDMA	194.1	163 *	15
MDA	180.1	163.1 *	11

* Quota ion

MDMA: 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine; MDA: 3, 4-Methylenedioxyamphetamine

1.2 药品与试剂

对照品氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA、MDA(均为甲醇液,质量浓度为 1.00 mg/mL)均由泸州市公安局提供。甲醇、乙腈均为色谱纯,盐酸、碳酸钠和氢氧化钠等其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

对照储备溶液的制备:分别取氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA、MDA 标准品甲醇液 1 mL,稀释为 100 mL,置于 4 ℃ 冰箱保存。

1.3 实验动物

清洁级别大鼠,重量(200 ± 10)g,雌雄各半,西南医科大学动物实验中心提供(使用许可证号:SCXK(川)2018-17)。给药前禁食不禁水 12 h,灌胃给药。

1.4 尿液样品的制备

取健康人空白尿液 10 mL,分别添加氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA 和 MDA 对照储备液,配制成氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA、MDA 均为 1 μg/mL 的毒品尿液样品,备用。

1.5 操作方法

取尿液样品 5 mL 于 10 mL 样品瓶中,用 1.25 mol/mL HCl 和 NaOH 溶液调节 pH 至 11,加入 Na₂CO₃ 0.5 g,放入磁搅拌子,拧紧瓶盖,将样品瓶置于 SPME 专用采样台上于 60 ℃ 下加热搅拌,同时将经老化过的含 60 μm 聚二甲基硅烷-二乙烯基苯共聚物萃取头(PDMS/DVB)的 SPME 针管插入样品瓶中,推出萃取纤维头,使之浸入样品液中萃取 15 min 后取出,再将 SPME 针管插入 SPME/HPLC 接口解吸池中解析 1 min 后,进行数据采集。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱及流动相的考察

预实验中比较了 C_{18} 柱 (2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μ m) 和 C_{18} 柱 (4.6 mm \times 100 mm, 2.7 μ m) 的检测效果, 发现因所检测的氯胺酮和 MDMA 等物质含有胺基和羰基等基团, 为中等偏强极性物质, 所以其保留时间较短, 均在 0.6 min 左右出峰, 为了提高分离效果, 最终选择了 EC- C_{18} 柱 (4.6 mm \times 100 mm, 2.7 μ m) 作为分析柱。

氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA 和 MDA 的保留

时间、分离度和峰行受流动相体系及其 PH 的影响。本实验分别考察了甲醇/乙腈-水、甲醇/乙腈-甲酸水溶液、甲酸乙腈-水溶液和甲酸乙腈-甲酸溶液体系等作为流动相。结果表明, 在酸性条件下, 有助于化合物母离子的形成。比较甲酸体积分数为 0.1%、0.2%、0.3% 时, 发现增大甲酸浓度对化合物检测灵敏度影响不大, 因此, 最终选择甲醇和 0.1% 甲酸水溶液体系作为流动相。

按以上色谱柱与流动相对混合毒品进行检测, 氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA 和 MDA 的保留时间分别为 6.52、6.60、4.99、5.03 min, 见图 1。

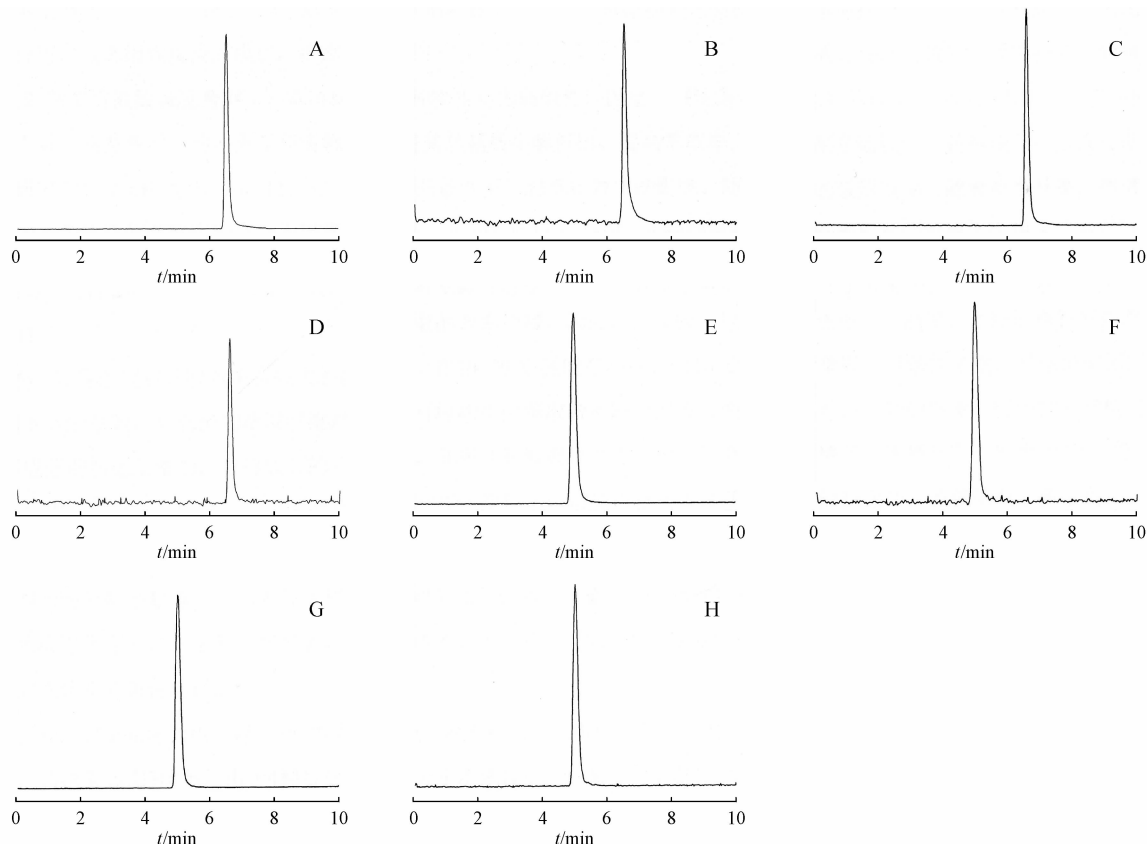


Figure 1 SIM chromatogram of ketamine, norketamine, MDMA, and MDA

A: Ketamine, m/z 238. 1; B: Ketamine, m/z 179; C: Norketamine, m/z 224. 1; D: Norketamine, m/z 207; E: MDMA, m/z 194. 1; F: MDMA, m/z 163; G: MDA, m/z 180. 1; H: MDA, m/z 163. 1

2.2 固相微萃取前处理影响因素考察

2.2.1 萃取纤维种类和萃取模式考察 在实验中主要选择了 3 种不同极性且适合于 HPLC 进样分析的萃取头进行考察: 85 μ m 聚丙烯 (PA)、100 μ m 聚二甲基硅氧烷 (PDMS)、60 μ m 聚二甲基硅烷-二乙烯基苯共聚物萃取头 (PDMS/DVB), 在相同的萃取条件下进行直接浸入式 (DI-SPME) 萃取, 以峰面积大小作为萃取效果的评价指标, 结果表明, 由于 PA

萃取头对强极性的物质富集效果更好, PDMS 萃取头对弱极性物质的萃取效果更好, 故这两种萃取头的萃取效率略低。比较而言, PDMS/DVB 共聚物极性介于前两者之间, 且适合于对胺类化合物的提取, 故其萃取效率较前两者高。

固相微萃取分为直接浸入模式 (DI-SPME) 和顶空模式 (HS-SPME) 两种方式, 由于本次检测目的是以 HPLC 为检测手段对两种毒品在体内的微

量原型物和代谢物样品进行分析,故选用直接浸入模式,提高萃取效率。

2.2.2 萃取溶液酸碱度考察 本次检测的 4 种物质均为弱碱性,因此在碱性条件下,有利于减少其在基质中的电离度和溶解度,促进其从基质中解析出,提高萃取率。为此,本研究考察了 pH 为 9,10,11,12,13 的不同条件下,对萃取效果的影响。随着 pH 的增加,各物质的萃取率均存在不同程度的上升,在 pH 为 11 以后时,4 种物质的萃取率基本保持恒定,且尿液基质中开始出现少许沉淀(可能在较强碱性条件下,其中的蛋白质成分变性所致),故选择萃取酸碱度为 pH 11。

2.2.3 萃取温度和时间考察 查阅相关文献[4],发现温度对萃取效果有较大的影响,其机制是通过改变目标成分在溶液与萃取介质间的分配系数,从而影响萃取纤维对目标成分的吸附效率。随着温度升高,溶液中目标成分的热运动增加,目标成分的分子向萃取纤维扩散的概率大大提高,从而达到富集目标成分的目的。但是,当温度过高时,将导致萃取纤维中的目标成分向溶液中扩散,破坏了分配平衡,这种反相扩散有可能导致萃取的效率锐减。因此,在实验过程中,须筛选适宜的温度,才能取得较好的萃取效果。

在 30 ~ 70 °C 区间范围内,以 10 °C 递增进行萃取温度条件考察,其结果如图 2 所示,4 种目标物质的萃取效率随着温度改变呈现先上升后下降的现象,因各物质结构间存在差异,其最佳萃取温度并不一致,综合考虑具体情况,选择萃取温度为 60 °C,同时,在萃取时加入搅拌子以增加待测物质在基质溶液中的热运动,改善萃取平衡系数。

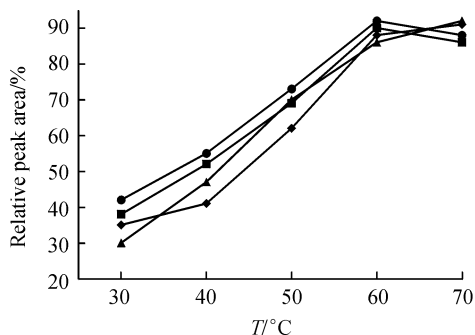


Figure 2 Influence of temperature to the content of extraction

目标物质在基质溶液与萃取介质间的平衡时间受其物理化学性质(如化学结构、在两相间的分

配系数等)、基质条件和萃取介质吸附特性等多种因素决定,萃取时间短,介质吸附不充分,未达到分配平衡,目标物回收率较低,萃取时间过长,实验费时,达不到优化实验条件的目的。

在 5 ~ 25 min 区间内,以每 5 分钟为一检测点,峰面积为检测指标,选择合适的萃取时间,其结果如图 3 所示。由于 4 种目标物质相对分子质量较小,在基质与萃取介质间的能较快地达到平衡,故选择萃取时间为 15 min。

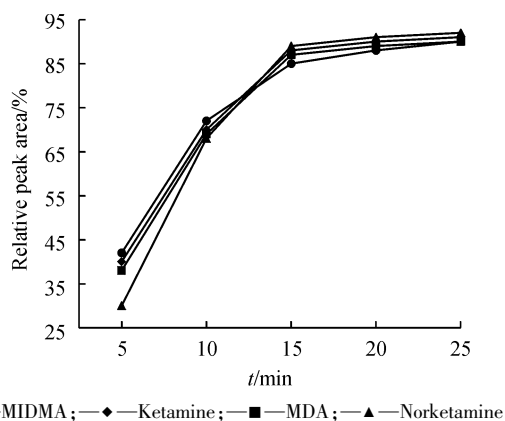


Figure 3 Influence of time to the content of extraction

2.2.4 盐效应考察 实验发现,无机盐可使溶液中离子总浓度增大,离子强度增加,导致目标成分在溶液中的电离程度降低和溶解减少,打破了目标成分在溶液与萃取纤维中的原有平衡,萃取纤维对目标成分的亲和性增大,提高了萃取纤维的吸附效率。本实验考察了两种常见的无机盐: NaCl 和 Na₂CO₃。将其加入尿液基质中,结果发现添加 Na₂CO₃ 后,4 种待测物的萃取率略有提升,当 Na₂CO₃ 的量增加后,4 种待测物的萃取效果略有上升,而其加入量达到 0.6 g 时,基质尿液略微出现混浊现象,故将 Na₂CO₃ 的加入量确定为 0.5 g。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性范围及检测限 取空白尿液检材 5 份,添加氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA、MDA 对照品,用流动相稀释,配制成 0.03、0.20、0.50、0.75 和 1.0 μg/mL 系列质量浓度对照品的尿液样本,按以上所述实验方法进行目标物提取与检测分析,以待测物定量离子峰面积 Y 为纵坐标,以所配制的系列对照品浓度 X 为横坐标,汇制标准曲线,得到 4 种待测物的线性方程、其各自的相关系数 r 和

最低检出限(检测时信噪比为 $S/N=3$)见表 2。结果表明,4 种待测物在 $0.03 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

Table 2 Linear equations, correlation coefficient and detection limit ($S/N, n=3$)

Analyte	Linear regression equation	r	Detection limit/(ng/mL)
Ketamine	$Y=5.527 \times 10^4 X - 4.150 \times 10^{-1}$	0.999 2	11.2
Norketamine	$Y=7.769 \times 10^4 X - 8.998 \times 10^{-1}$	0.999 1	10.8
MDMA	$Y=3.000 \times 10^5 X - 6.103 \times 10^{-2}$	0.998 9	13.6
MDA	$Y=3.850 \times 10^5 X - 1.266 \times 10^{-2}$	0.998 5	14.3

2.3.2 加样回收试验及精密度考察 取空白尿液,分别加入高、中、低 3 个浓度的对照品,配制成 5 个平行样品,按照“1.1”、“1.5”项下进行检测分析,连续测定 3 d,并记录色谱峰面积,计算氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA、MDA 的日内、日间精密度,结果如下表 3 所示。

在 4 种待测物线性方程范围内,取高、中、低 3 个浓度分别添加对照品,配制成 5 个平行样本检材,然后按“1.1”、“1.5”项下进行样品处理、分析。以所添加待测物的峰面积与相同浓度标准品的峰面积之比值计算回收率(结果见表 3)。

Table 3 Results of recovery and reproducibility test ($n=5$)

Compound	$c/$ ($\mu\text{g/mL}$)	RSD within day/%	Inter-day RSD/%	Average recovery/%
Ketamine	0.05	4.21	5.35	103.44
	0.20	1.65	2.33	101.26
	1.00	3.77	4.26	102.18
Norketamine	0.05	5.69	6.32	101.85
	0.20	2.31	3.66	99.86
	1.00	4.78	6.46	104.38
MDMA	0.05	6.80	8.17	97.19
	0.20	3.68	5.06	99.32
	1.00	7.32	8.96	102.88
MDA	0.05	4.79	6.28	98.27
	0.20	2.96	3.95	101.63
	1.00	8.55	9.13	105.44

2.4 样品分析

据文献文献[5-6]报道,大鼠以氯胺酮 290 mg/kg 灌胃给药后,出现急性中毒现象,大鼠灌胃给药 150 mg/kg MDMA 后,也同样出现急性中毒。根据现在毒品的吸食模式,综合考虑动物生命周期,取喂食“K 粉”与“摇头丸”粉末(“摇头丸”研磨成粉状)(氯胺酮按 280 mg/kg 灌胃,MDMA 按 140 mg/kg 灌胃)的急性中毒大鼠 24 h 内自然排泄尿液样品 5 mL ,按以上所述试验方法进行检验,检材中分别出现与对照品相对应的质谱

图,因此可认定检材中存在氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA 和 MDA 4 种成分。进一步测定得出该尿液样本中的氯胺酮、去甲氯胺酮、MDMA 和 MDA 的含量分别为 2.02 、 3.01 、 1.05 、 $1.98 \mu\text{g/mL}$ 。

3 结 论

本试验采用 SPME-HPLC-MS 法对尿液中的“K 粉”与“摇头丸”混合毒品及其体内主要代谢产物进行了定性和定量分析,本方法操作便捷,结果准确,可为公安机关对吸毒嫌疑人的尿液等生物样品进行检测提供新的方法,为公安机关打击毒品犯罪提供法庭证据。

参 考 文 献

- [1] Zhai WF, Zhang CS, Gao LS, et al. Simultaneous detection of 17 kinds of abused drugs by LC-MS[J]. *Forensic Sci Technol* (刑事技术), 2014, **39**(3): 24-25.
- [2] Chen LL, Liao LC, Li WJ, et al. Determination of ketamine and norketamine in blood and urine by high performance liquid chromatography[J]. *J Foren Sci Med* (法医学杂志), 2008, **24**(1): 38-42.
- [3] Li HS, Huang KJ, Lin CW, et al. Rapid simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine using HS/SPME and GC/MS[J]. *J Guangxi Univ* (Nat Sci Ed) (广西大学学报 自然科学版), 2007, **32**(3): 266-269.
- [4] Zhang L, Li LY, Li SM, et al. Application of solid phase microextraction testing technology and analysis of its influencing factors[J]. *Chin J Public Health* (中国公共卫生), 2005, **21**(6): 746-747.
- [5] Liang M, Li XB, Zhang HD, et al. Effect of long-term drinking on postmortem redistribution of MDMA in acute poisoned rats[J]. *Chin J Forensic Med* (中国法医学杂志), 2012, **27**(1): 1-4, 8.
- [6] Jia J. Distribution and postmortem redistribution of ketamine in rats (氯胺酮在急性中毒大鼠体内的分布与死后再分布)[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2006.