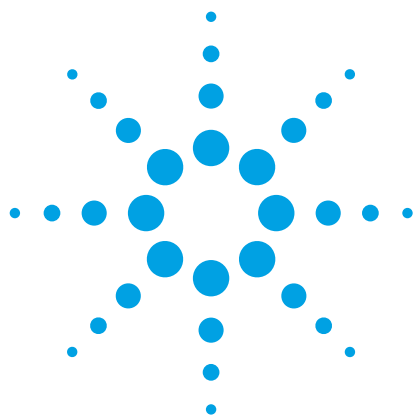




经过验证的三重四极杆液质联用 LC/MS/MS 方法用于尿液中“浴盐”类常规组分，亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮的定量分析

应用报告

法医

作者

Guiping Lu, Ph.D.
Bert Toivola Ph.D.
Sterling Reference Laboratories,
2617 East L Street,
Tacoma, WA 98421

Thomas J. Gluodenis, Jr., Ph.D.,
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road,
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

由于合成卡西酮——被称为“浴盐”的化合物——的出现及其危险滥用，使得今天的法医实验室面临严峻的挑战，他们需要对生物基质样品中的此类化合物进行筛查、确证和定量分析。本应用报告描述并评估了一种可靠的定量分析方法，用于定量分析尿液中的两个受管制的合成卡西酮药物：亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮的定量分析方法。本方法被证实具有出色的线性、更低的检测限（LOD）、优异的重现性/精密度和更低的定量限（LOQ），以及没有结构类似化合物的干扰和极低的进样残留。



Agilent Technologies

前言

合成卡西酮，如亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮，在包括美国、欧洲和澳大利亚的很多国家中，均属于新型滥用药物。合成卡西酮在美国受到越来越多的关注，毒物控制中心接到的有关毒品举报的电话数量显著增加，从 2010 年的 304 个增加至 2011 年的 6138 个。其中特别值得关注的是，出现了几起使用这类药物致死的报告。

合成卡西酮是中枢神经（CNS）系统兴奋剂，其作用与甲基安非他明和摇头丸（亚甲二氧基甲基安非他明，MDMA）相似，但是更容易使人上瘾。图 1 显示了与卡西酮化学结构类似的化合物，他们是一些在东部非洲的卡塔叶植物中发现的活性生物碱，这些植物的新鲜叶子可以咀嚼或作为茶叶食用。食用后，卡西酮促使大脑释放多巴胺，能够导致人产生轻微的欢欣感和兴奋、食欲不振、口齿不清、情绪不稳定、便秘、狂躁行为以及昏昏欲睡的幻觉。

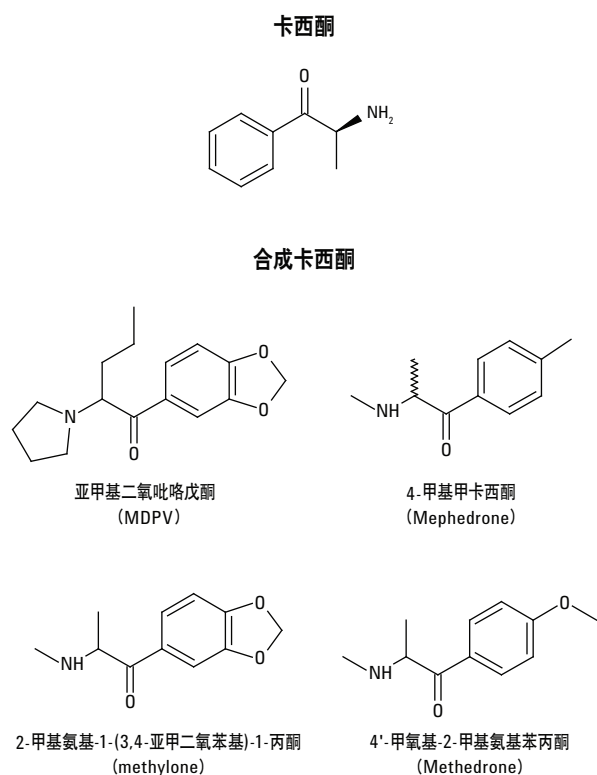


图 1. 卡西酮和常见的合成卡西酮类化合物

在美国，合成卡西酮能够通过互联网进行买卖交易，而便利店里则将其作为“浴盐”以各种品牌销售，如“象牙波”和“香草天空”。尤其是亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮具有与甲基安非他明、可卡因和摇头丸相似的作用。当过量使用该药物或者与其他药物结合使用时，还可能出现严重的不良反应，包括心率加快和血压增高、失眠、恶心、呕吐、幻觉、极度偏执和焦虑、惊厥、甚至死亡。

亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）是六十年代开始开发的，虽然没有发现其被 FDA 批准作为药物使用的历史记录，但是它曾被用于治疗慢性疲劳和厌食。目前在欧洲和澳大利亚，亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）氯化盐是以白色到褐色粉末流通，通常是以类似可卡因的方式被吸食。4-甲基甲卡西酮在 1929 年被首次合成，它外观是白色结晶或粉末，可以制成片状。

尽管亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮在几十年前就已经被开发出来，但直到 90 年代后期和 2000 年初期，它们才开始被广泛地关注。事实上，2008 年之前，它们主要在欧洲地区被滥用。鉴于这种情况，欧盟在 2010 年 12 月宣布这两种药物是非法的。

在美国，第一个有关于亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮的案子在 2008 年被报道。它们在美国的很多州都被禁用，美国缉毒署（DEA）从 2011 年 10 月开始暂时把亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮，以及 2-甲基氨基-1-(3,4-亚甲二氧苯基)-1-丙酮（methyldrone）放到管制药物法案附表 1 中。现在，在美国使用、持有、售卖或制造这些化合物都是非法的。

鉴于这些趋势，亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）、4-甲基甲卡西酮，以及其它合成卡西酮的法医检测力度将会大幅增加。由于这些化合物不能用现有的安非他明类兴奋剂的筛选免疫分析法或气质联用的确证分析法来检测，因此必须开发新的分析方法。本应用简报的目的就是介绍一种经过验证的用于尿液中亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮的筛查、确证和定量分析的 LC/MS/MS 方法。本方法由 Sterling 参考实验室和安捷伦科技共同开发，截止到本应用简报发表之前，本方法已经有效分析了 561 个病人样本。阳性率是 8%（45 个样本），其中 41 例（7.3%）是亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）阳性，3 例（0.5%）是 4-甲基甲卡西酮阳性，1 例（0.2%）是亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮阳性。

实验

方法概述

制备加标的尿液样品，然后用阳离子交换型固相萃取柱（SPE）萃取。之所以采用固相萃取而不是简单的样品稀释和直接进样，是因为固相萃取可以获得用于液质分析的干净样品。这种萃取方式能够使离子抑制效应和离子清洗工作量大大降低，同时灵敏度也大大提高。利用稀释和直接进样的方式能够将更脏的样品——直接稀释的尿液——导入液质。然而，对于很多分析“浴盐”类样品的数量非常少，并且不介意常常清洗离子源的实验室来说，“样品直接稀释及进样分析”的方式也许更受欢迎。

将提取的样品进样到配置电喷雾离子源的液质联用系统中。每个组分和内标化合物均通过监控两个 MRM 跃迁来完成。保留时间和所选择离子的比例（相对于内标物）被用于定性和定量分析。使用 MassHunter 数据分析软件建立校正曲线并进行定量分析。定量分析是通过待测组分的响应值插值法代入校正曲线来得到结果。分析方法根据以下指标进行评估和确证，如线性、更低的检测限和定量限、重现性、干扰物和残留。

合成尿液样品，校正溶液，质控样品和内标液

合成尿液样品（加标样品和阴性对照或空白样品）通过以下方法制备，用 800 mL 去离子水溶解相应组分。再用去离子水定容至 4000 mL。

20.0 g	氯化钠（ACS 试剂级）
2.0 g	肌酐（Sigma Cat. No. C4255-100G）
40.0 g	尿素（ACS 试剂级）
38.6 g	磷酸二氢钠一水合物（ACS 试剂级）
32.3 g	磷酸氢二钠七水合物（ACS 试剂级）
4.0 g	叠氮化钠（ACS 试剂级）
3 至 5 滴	黄色的食品色素（食品级，McCormick）

用 1% 的盐酸将合成尿液的 pH 值调节至 6.5。

校正溶液制备：用亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV, Cayman, Cat. No.10684）和 4-甲基甲卡西酮（Cerilliant Cat. No. M-138）甲醇

储备液制备校正溶液。为了建立浓度范围在 1 到 5000 ng/mL 的亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮校正曲线，用合成尿液制备加标浓度 1、5、10、25、50、100、500、1000 和 5000 ng/mL 的校正溶液。

质控（QC）样品。用合成尿液制备三个质控样品：阴性，40% 的阳性截止（cutoff）和 +25% 的阳性截止（cutoff）。阳性截止（cutoff）的设定为 25 ng/mL，所以对应的 40% 和 +25% 质控点分别是 10 ng/mL 和 31 ng/mL。

氘代内标溶液。溶于 HPLC 级甲醇中的 MDPV-D8（Cayman, Cat. No. 10679）和 4-甲基甲卡西酮-D3（Cerilliant, Cat. No. M-139）氘代内标溶液由去离子水配制成浓度为 500 ng/mL。

样品制备

图 2 所示为阳离子交换固相萃取的样品制备流程。该流程是按照每 8 小时轻松处理 300 个样品的要求设计的。

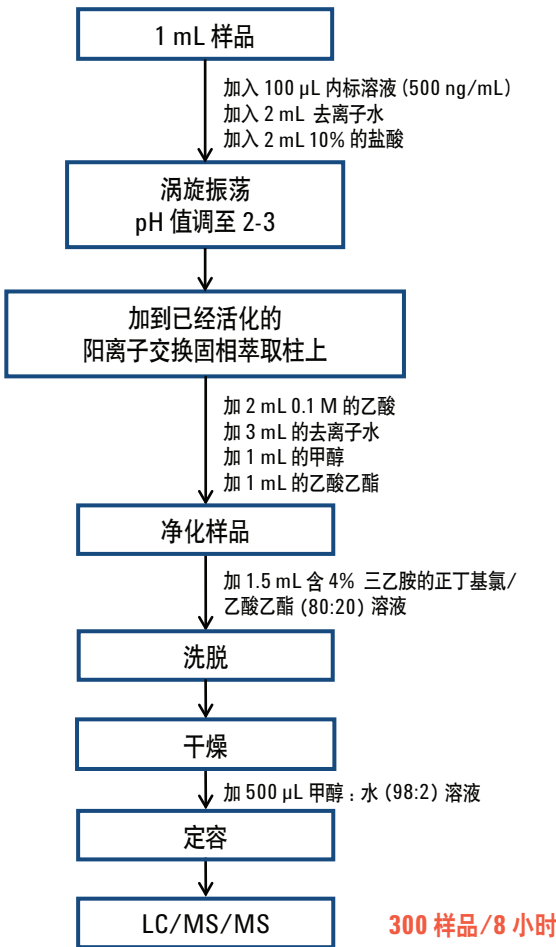


图 2. 样品制备流程

使用经过校正的微量移液器将 1 mL 校正液、40% 质控溶液、+25% 质控溶液和阴性对照尿样溶液分别转移至 16×100 mm 的培养管中。使用经过校正的移液器把 100 µL 浓度为 500 ng/mL 的内标液加入到装有样品的培养管中。每个培养管中分别加入去离子水（2 mL）。用 0.2 mL 的 10% 盐酸将 pH 值调至 2–3。

在 Multi-prep SPE 工作站（Biochemical Diagnostics）上进行样品的萃取。固相萃取柱是阳离子交换固相萃取柱（Biochemical Diagnostics, Cat. No. 1410082-0, GV-65），用 1 mL 甲醇、1 mL 的 5% 亚硫酸氢钠溶液进行活化（溶液在重力作用下流过萃取柱）。

将每个已制备的样品分别加入到相应的固相萃取柱上来进行萃取。之后将 2 mL 0.1 M 的乙酸溶液加入到 SPE 柱上，然后加入 3 mL 去离子水、1 mL 甲醇，最后加入 1 mL 乙酸乙酯。在每一次溶液添加的间隔，溶液都是利用重力的方式自然通过萃取柱直到色谱柱中观察不到液体为止。

样品从真空泵外进入到洗脱管进行洗脱。将洗脱溶剂（1.5 mL），含 4% 三乙胺的正丁氯/乙酸乙酯（80:20）的溶液，加入到每个萃取柱上，洗脱液靠重力流过萃取柱直到色谱柱中观察不到液体为止。然后将收集管放到铝质加热模块上，在 34–40°C 的温度下，用氮气轻吹至近干。

用 0.5 mL 的甲醇：去离子水（2:98）定容，在放到自动进样器之前，在室温下放置 20 分钟。一旦样品定容后，它们需立即进行 LC/MS/MS 分析。

LC/MS/MS 分析

液质分析是在安捷伦 1200 系列液相色谱/6460 型三重四极杆质谱上进行的。每个样品的分析时间是 4.2 min。液相色谱系统包括自动进样器、脱气机、二元泵和柱温箱。色谱柱是安捷伦的 Polaris C18 色谱柱。液相色谱的参数见表 1。

表 1. 液相色谱运行参数

色谱柱	安捷伦 Polaris C18, 50 × 2.0 mm, 5 µm			
进样体积	1 µL			
LC 梯度	时间	流速	流动相 B	流动相 A
	0	0.8	2%	98%
	2	0.8	30%	70%
	2.5	0.8	90%	10%
	3.5	0.8	90%	10%
	3.6	0.8	2%	98%
流动相 A	含 0.1% 甲酸的去离子水溶液			
流动相 B	含 0.1% 甲酸的甲醇溶液			

安捷伦 6460 型三重四极杆液质联用系统配置了在正离子模式下运行的电喷雾离子源（ESI）。质谱参数见表 2。

表 2. 质谱运行参数

雾化器	氮气（高纯度），99.999%	
碰撞反应池气体	氮气（高纯度），99.999%	
离子源参数	气体温度	300°C
	气体流速	10 L/min
	雾化气压力	20 psi
	鞘流气温度	350°C
	鞘流气流速	8 L/min
	毛细管电压	4000 V
	喷嘴电压	0 V
检测器参数	EMV	200

对于每个待测组分和内标均通过监控两个 MRM 跃迁来完成。对于亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮的 MRM 跃迁和 MS/MS 具体参数见表 3。

表 3. MRM 跃迁和 MS/MS 参数

化合物	母离子	受监控的子离子	驻留时间 (ms)	碎裂电压	碰撞能量电压
4-甲基甲卡西酮	178.1	160.1/145.0	50	95	8/20
4-甲基甲卡西酮-D3	181.1	163.1/148.1	50	90	8/20
亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV)	276.2	135.0/126.1	50	130	24/24
亚甲基二氧吡咯戊酮-D8	284.2	134.5/149.0	50	130	28/32

建立校正曲线

为了建立线性从 1 到 5000 mg/mL 的亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮的校正曲线, 每个浓度水平 (1、5、10、25、50、100、500、1000 和 5000 ng/mL) 都进五次样 (n=5)。在安捷伦 MassHunter 软件上用最小二乘法线性回归法建立内标校正曲线, 即待测物峰强度/内标组分峰强度 vs 待测物/内标物浓度的比值。

结果与讨论

合成尿液样品中浓度为 25 ng/mL 的氘代和非氘代的亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮的总离子流 (TIC) 和 MRM 离子流图见图 3。由于 LC/MS/MS 技术的高选择性, 化学噪音基本可以被忽略, 信号响应很强。同时能够观察到定量离子峰形是完美的高斯分布峰。

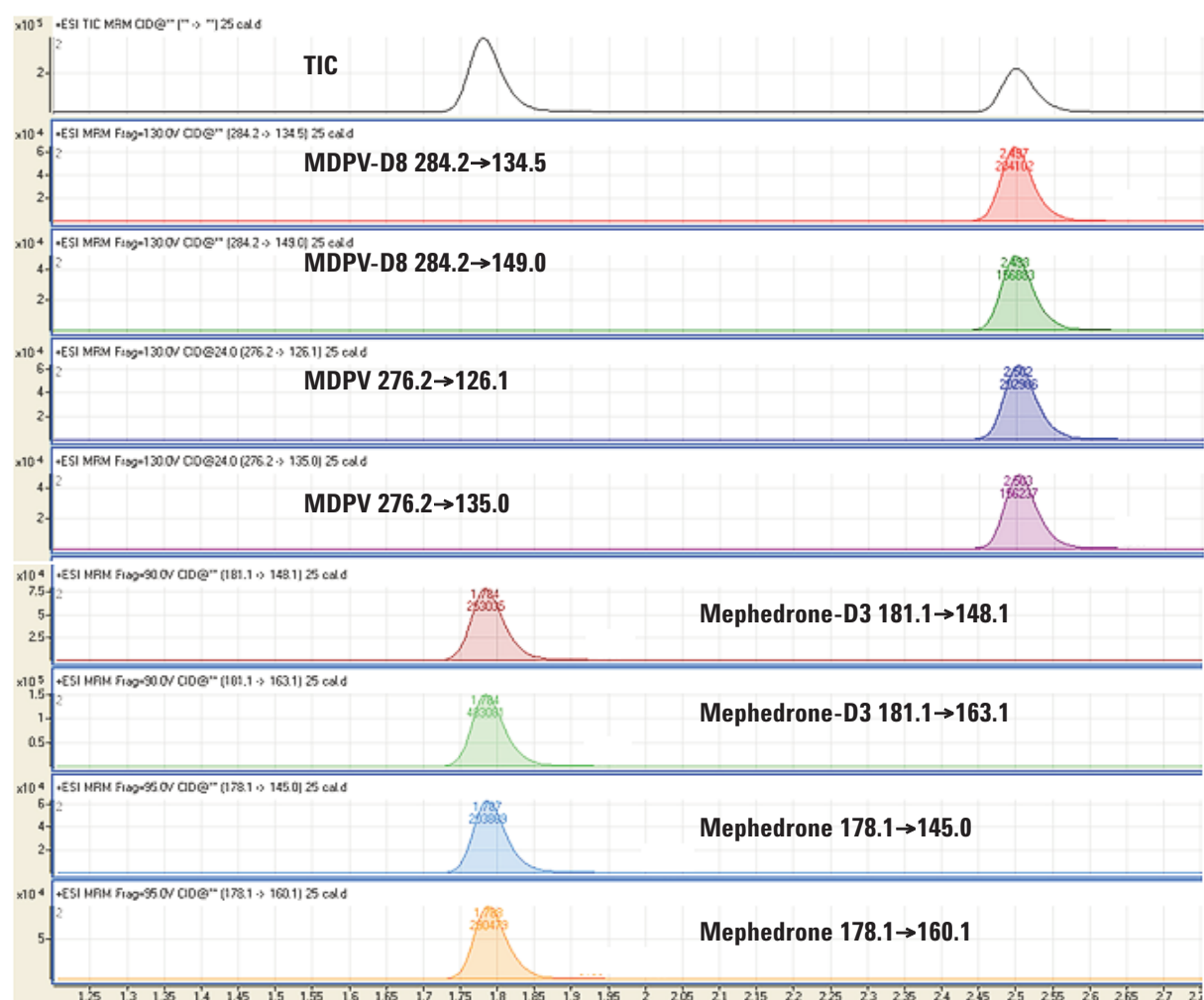
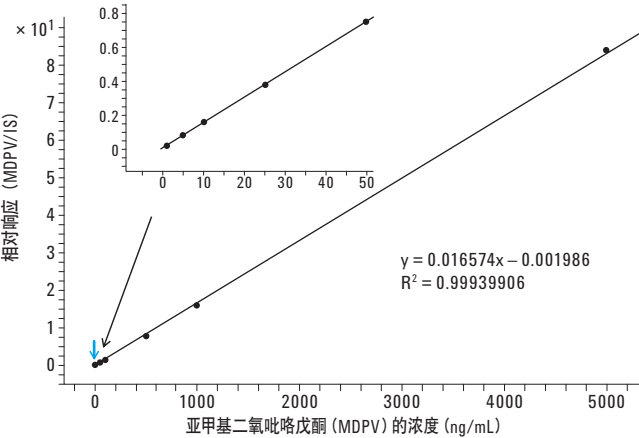


图 3. 合成尿液样品中浓度为 25 ng/mL 的氘代和非氘代的亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮的总离子流 (TIC) 和 MRM 离子流图。25 ng/mL 浓度下的所有组分的响应都很强

合成尿液中加标的亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮建立的浓度范围是 1 至 5000 ng/mL 的校正曲线, 见图 4。在整个浓度范围内具有优异的线性, 包括校正曲线的下限, 其平均线性系数 (R^2) 优于 0.999。



根据 5 次重复实验的数据结果显示, 对于浓度为 1ng/mL 的亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮, 其平均信噪比 (S/N) 分别是 19 ± 6 和 24 ± 9 。理论上, 其检测限会更低, 但是 1 ng/mL 的检测限可以用于几乎全部的实际样品分析。图 5 和 6 显示了浓度为 1ng/mL 的亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮的方法响应值。

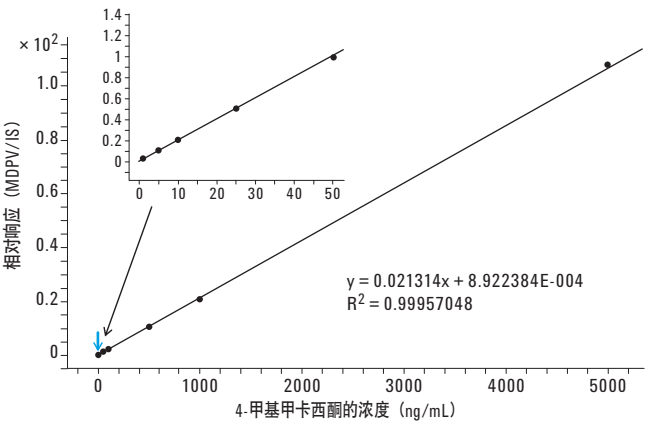


图 4. 亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮的校正曲线, 具有优异的线性, 甚至在低浓度区域范围 (见插图) 也具有良好的线性

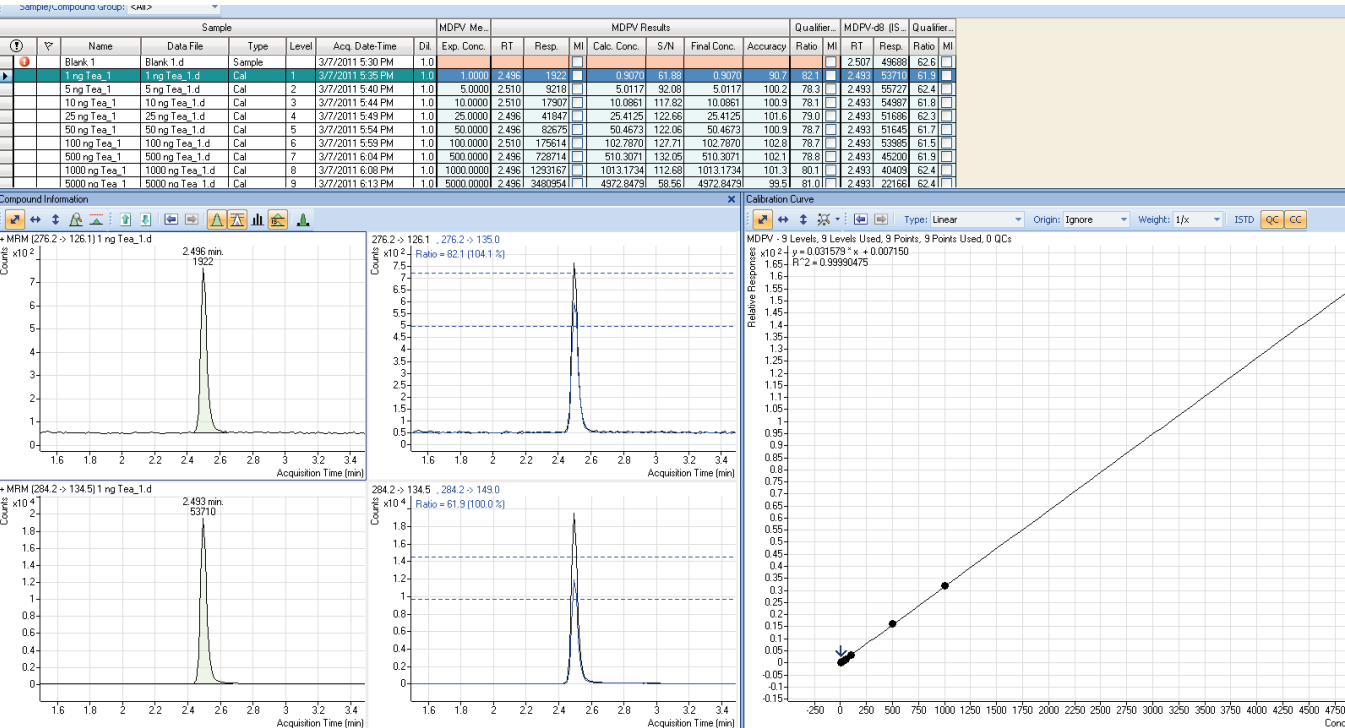


图 5. 浓度为 1 ng/mL 的亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 的方法响应值

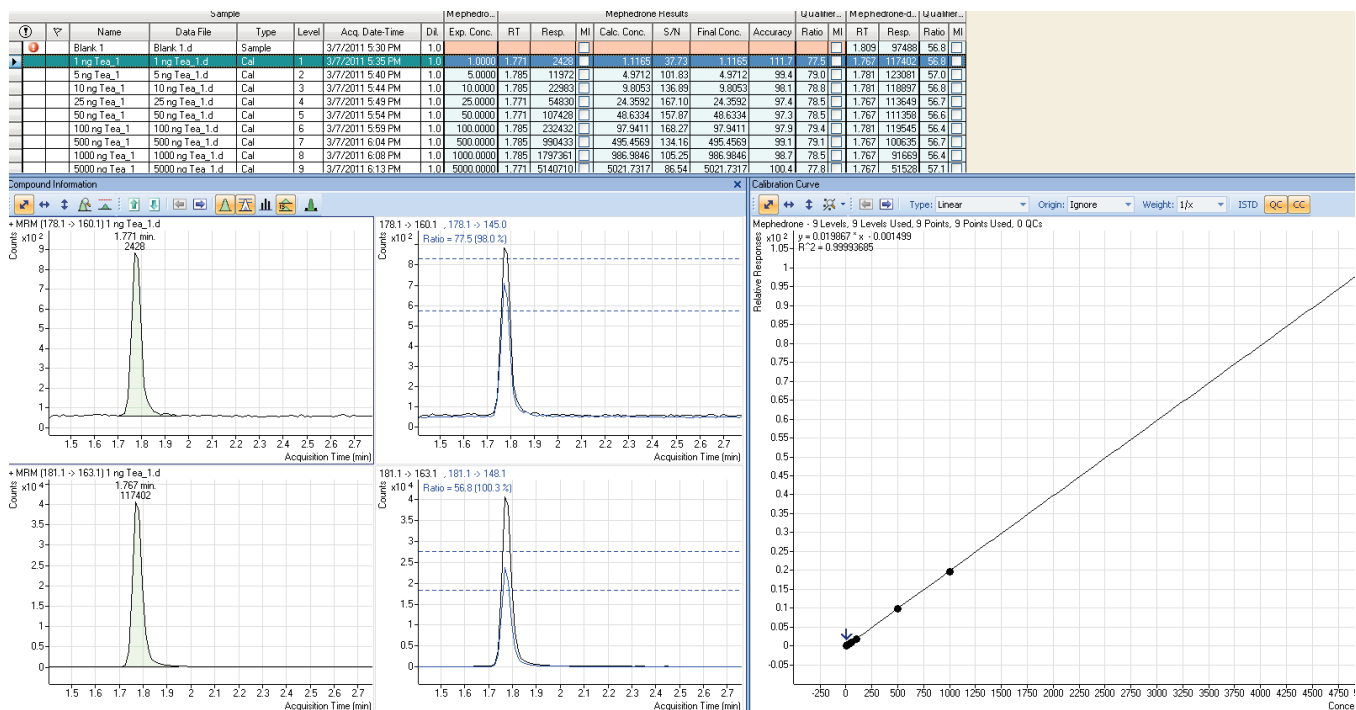


图 6. 浓度为 1 ng/mL 4-甲基甲卡西酮的方法响应值, 检测限 (LOD)

合成尿液样品中的 9 个浓度的加标样品分析结果具有优异的方法重现性 ($n=5$), 见表 5。相对标准偏差 (RSD) 在 5% 以内。对于 5 ng/mL (校正曲线的第二低的点) 的样品, 结果准确度大于 80%。这个点被定义为合理的定量限 (LOQ)。

表 4. 合成尿液样品中校正化合物的方法精度 ($n=5$)

预期浓度 ng/mL	平均浓度, ng/mL	
	MDPV (RSD%)	Mephedrone (RSD%)
1	1.33 (3.83%)	1.21 (4.91%)
5	4.98 (3.98%)	4.96 (3.14%)
10	9.53 (2.49%)	9.69 (1.72%)
25	22.61 (1.84%)	23.94 (1.81%)
50	45.65 (2.64%)	47.17 (0.82%)
100	93.81 (3.12%)	96.81 (1.32%)
500	479.46 (0.92%)	485.71 (1.79%)
1000	991.13 (1.40%)	975.75 (0.98%)
5000	5042.34 (0.33%)	5045.73 (0.39%)

尽管还没有法规的要求值, 但是对于亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮来说, 25 ng/mL 似乎是一种合理的选择。

为了测试可能的干扰物, 选择 6 个结构与亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮相似的化合物添加到空白尿液中, 得到浓度相对较高的苯丙醇胺 (PPA), 麻黄碱, 伪麻黄碱, 芬特明, 安非他明和甲基安非他明溶液, 其浓度分别为 1×10^6 、 1×10^6 、 1×10^6 、 5×10^4 、 5×10^3 以及 5×10^3 ng/mL。图 7 显示了这些化合物的结构和分子量。因为上述化合物的分子量与亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮都有所不同, 所以预计观察不到干扰。样品按照上述的程序进行制备、提取和液质分析。

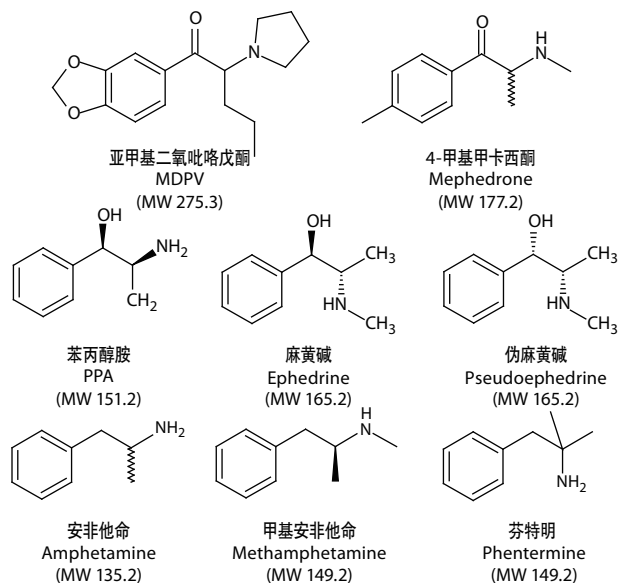


图 7. 与亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮结构相似的 6 个化合物的结构

正如预计的一样, 未发现干扰。图 8 显示了添加 1×10^6 ng/mL 高浓度麻黄碱的空白尿液的 MRM 色谱图。显示的 4 个峰分别是 MDPV-D8 和 mephedrone-D3 跃迁得到的。

为了测试残留效应, 在完成 5 次浓度为 10000 ng/mL 的亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮的进样分析之后, 进行阴性对照尿液的分析。仅仅观测到很小的由于残留带来的小峰。图 9 和 10 显示了计算得到的亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 和 4-甲基甲卡西酮的浓度分别是 3.18 ng/mL 和 1.53 ng/mL。由于这些值远远低于阈值 (25 ng/mL), 所以残留可以忽略不计。

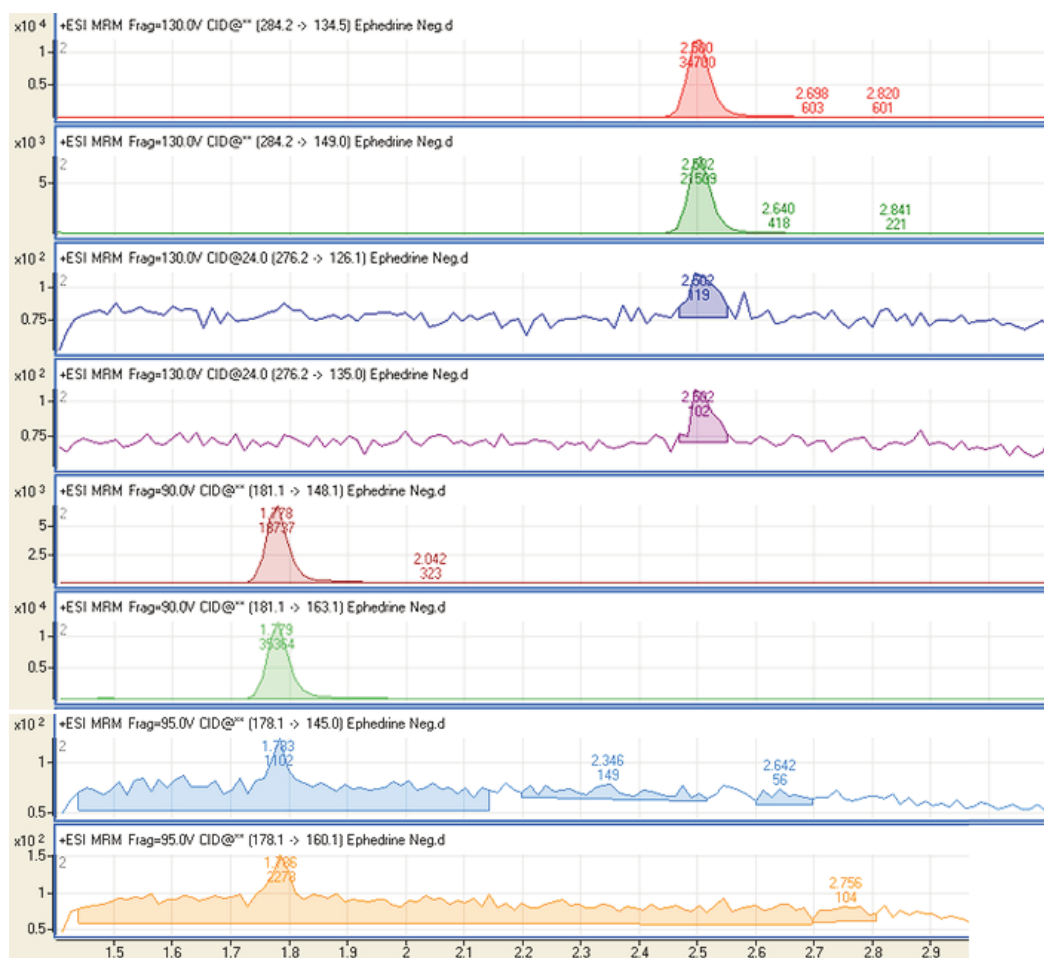


图 8. 添加了浓度为 1×10^6 ng/mL 的麻黄碱的空白尿液的 MRM 色谱图。未发现干扰

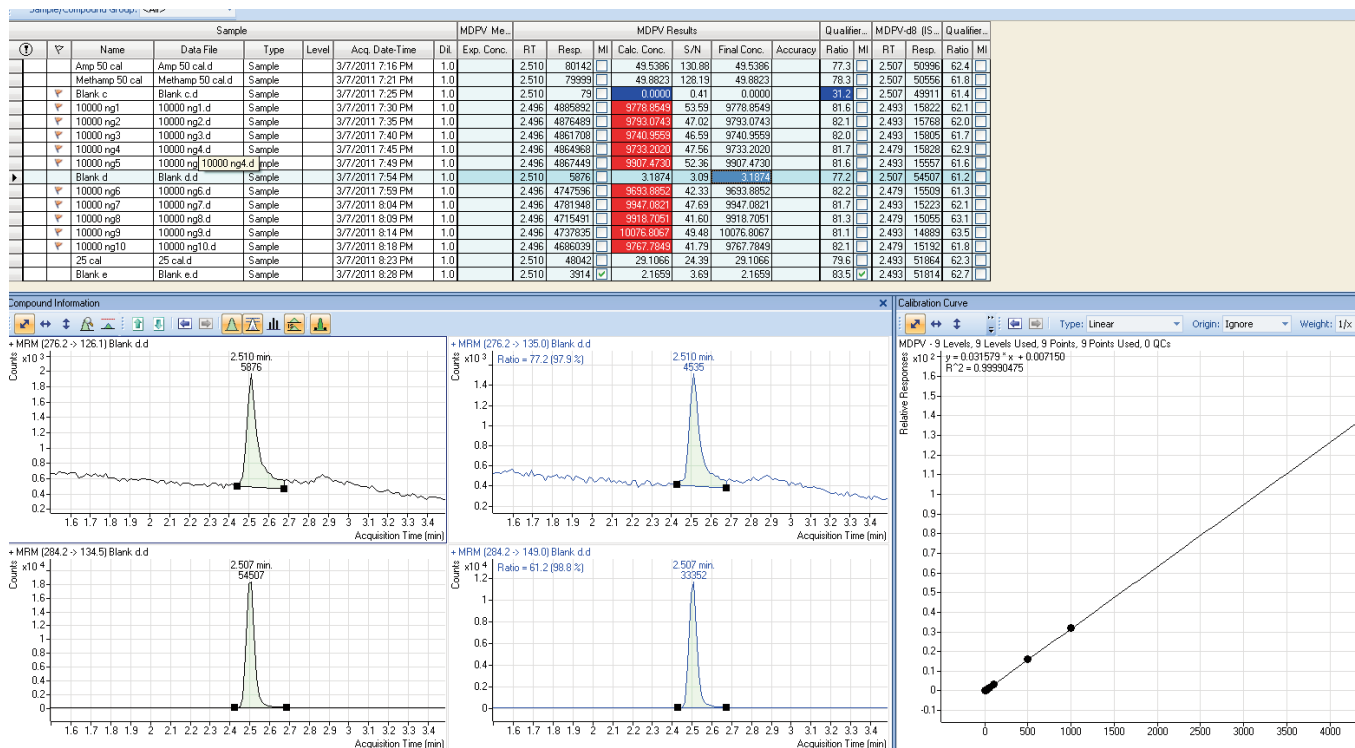


图 9. 亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 的残留仅为 3.18 ng/mL, 远远低于阈值 25 ng/mL, 可以忽略不计

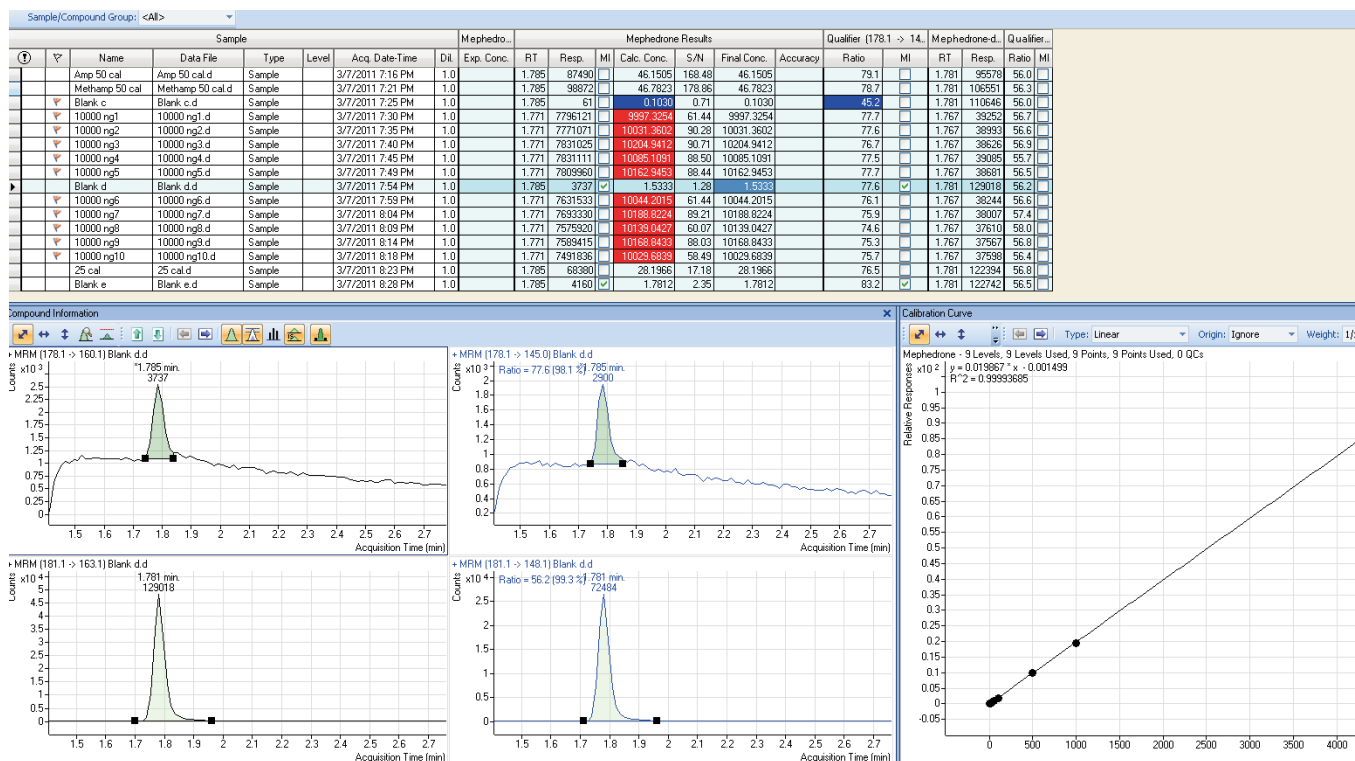


图 10. 4-甲基甲卡西酮的残留仅为 1.53 ng/mL, 远远低于阈值 25 ng/mL, 可以忽略不计

结论

由于其高选择性和高灵敏度，LC/MS/MS 为复杂生物基质如尿液中合成卡西酮药物（亚甲基二氧吡咯戊酮（MDPV）和 4-甲基甲卡西酮）的筛查、确证和定量分析提供了理想有效地检测手段。本应用简报描述的 LC/MS/MS 方法为法医实验室提供了方便、易用和可靠的分析手段，它具有优异的线性、检测限、重现性和定量限，同时不存在干扰并且残留可忽略不计。此方法也可以简单地进行修改以用于其它合成卡西酮的检测。

其他参考材料

1. 美国毒物控制中心协会 <http://www.aapcc.org>。
2. 美国缉毒署（DEA）药物性能表，浴盐或合成卡西酮（合成兴奋剂）。
http://www.justice.gov/dea/pubs/abuse/drug_data_sheets/Bath_Salts.pdf
3. Federal Register Vol. 76, No. 174. September 8, 2011.
4. Spiller, H.A. et al. Clinical experience with and analytical confirmation of "bath salts" and "legal highs" (synthetic cathinones) in the United States. Clin. Toxicol. 2011; Jul;49(6): 499-505.

更多信息

本文中的数据仅代表测定的典型结果。有关我们产品和服务更多地信息，请访问我们的网站
www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 5 月 22 日，中国印刷
5991-0180CHCN



Agilent Technologies