

超高效液相色谱 – 四极杆飞行时间质谱同时检测 血样中4种卡西酮类新精神活性物质

刘 静¹, 何洪源^{1*}, 倪春芳^{2*}, 曹芳琦³, 赵海波^{1,4}, 徐 琳¹

(1. 中国人民公安大学 侦查与刑事科学技术学院, 北京 100038; 2. 上海市公安局物证鉴定中心 上海市现场物证重点实验室, 上海 200083; 3. 上海市刑事科学技术研究院 上海市现场物证重点实验室, 上海 200083; 4. 太原市公安局迎泽分局, 山西 太原 030045)

摘要: 建立了同时检测血样中3, 4-亚甲二氧基甲卡西酮(Methylone)、3, 4-亚甲二氧基乙卡西酮(Ethylone)、4-氯甲卡西酮(4-CMC)、4-氯乙卡西酮(4-CEC)4种卡西酮类新精神活性物质的超高效液相色谱 – 四极杆飞行时间质谱法(UHPLC – QTOF MS/MS)。取0.5 mL血液, 按体积比5 : 2 : 13将血液、水和乙腈混合, 涡旋振荡1 min, 以12 000 r/min离心15 min将蛋白沉淀, 取上清液待测。采用Acquity UPLC[®] BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)分离, 0.1%甲酸 – 水(5 mmol/L乙酸铵)和乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 采用多反应监测(MRM)模式, 正离子[M + H]⁺扫描检测。结果表明, 4种目标药物在5 ~ 500 ng/mL质量浓度范围内线性关系良好, 检出限为2 ng/mL, 定量下限为5 ng/mL, 回收率为87.3% ~ 111%, 日内和日间相对标准偏差分别不大于8.1%和8.6%。该方法可同时检测血样中4种卡西酮类新精神活性物质, 满足实际检验需要。

关键词: 超高效液相色谱 – 四极杆飞行时间质谱; 卡西酮类新精神活性物质; 沉淀蛋白; 血样

中图分类号: O657.7; R991 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2020)12-1521-06

Simultaneous Determination of Four New Psychoactive Substances of Cathinone in Blood Samples by Ultra-high Performance Liquid Chromatography – Quadrupole – Time-of-flight Mass Spectrometry

LIU Jing¹, HE Hong-yuan^{1*}, NI Chun-fang^{2*}, CAO Fang-qi³, ZHAO Hai-bo^{1,4}, XU Lin¹

(1. School of Criminal Science and Technology, Chinese National Police University, Beijing 100038, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Crime Scene Evidence, Shanghai Public Security Bureau Material Certification Center, Shanghai 200083, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Physical Evidence, Shanghai Institute of Criminal Science and Technology, Shanghai 200083, China; 4. Yingze Branch of Taiyuan Public Security Bureau, Taiyuan 030045, China)

Abstract: An ultra-high performance liquid chromatography – quadrupole – time-of-flight mass spectrometry (UHPLC – QTOF MS/MS) was established for the simultaneous determination of 4 kinds of new psychoactive substances of cathinone in blood samples, including 1-(3, 4-methylenedioxyphenyl)-2-methylaminopropan-1-one (methylone), 1-(3, 4-methylenedioxyphenyl)-2-ethylaminopropan-1-one (ethylone), 1-(4-chlorophenyl)-2-methylaminopropan-1-one (4-CMC) and 1-(4-chlorophenyl)-2-ethylaminopropan-1-one (4-CEC). 0.5 mL blood sample was mixed with water and acetonitrile by a volume ratio of 5 : 2 : 13, vortex-oscillated for 1 min, and centrifuged at 12 000 r/min for 15 min to precipitate the protein. The supernatant was separated on an Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), with 0.1% formic acid – water (5 mmol/L ammonium acetate) and acetonitrile as mobile phases by gradient elution, and detected in positive ion [M + H]⁺ scanning under multiple reaction monitoring (MRM) mode. Results showed that there were good linear relationships for four target drugs in the concentration range of 5 – 500 ng/mL, with the limits of

收稿日期: 2020-06-18; 修回日期: 2020-07-30

基金项目: 国家重点研发计划课题(2017YFC0822001); 中国人民公安大学基本科研业务费(2020GKF102); 中国人民公安大学2019年拔尖人才培养专项资助硕士研究生科研创新资助项目(2019ssky007)

* 通讯作者: 何洪源, 博士, 教授, 研究方向: 理化检验, E-mail: 13311296819@189.cn
倪春芳, 高级工程师, 研究方向: 理化检验, E-mail: 13601982159@163.com

detection and limits of quantitation of 2 ng/mL and 5 ng/mL, respectively. The recoveries ranged from 87.3% to 111% with the intra-day precision and inter-day precision not more than 8.1% and 8.6%, respectively. The method could be used for the simultaneous detection of 4 new psychoactive substances of cathinone in blood samples to meet the needs of actual inspection work.

Key words: ultra-high performance liquid chromatography – quadrupole – time-of-flight mass spectrometry (UHPLC – QTOF MS/MS); new psychoactive substances of cathinone; precipitated protein; blood sample

当前,新精神活性物质(NPS)在全世界范围内迅速蔓延^[1]。合成卡西酮类新精神活性物质是苯丙胺类兴奋剂的 β -酮类衍生物^[2]。近年来,该类物质作为传统药物和滥用药物的“合法”替代品被越来越多地引入毒品市场^[3],已成为全球公共健康和生命安全的主要威胁之一^[4]。病例报告和临床研究表明,该类药物会对人体的中枢神经产生强烈的刺激作用,长期使用会产生严重精神疾病,甚至死亡。此外,为了获得与管制毒品相同或更强的兴奋、致幻等效果,其制剂通常混合多种结构类似药物,导致检材成分复杂,实际检验工作难度大。

本研究选取 3, 4-亚甲二氧基甲卡西酮(Methylone)、3, 4-亚甲二氧基乙卡西酮(Ethylone)、4-氯甲卡西酮(4-CMC)和 4-氯乙卡西酮(4-CEC)(见图 1)4 种新兴的卡西酮类新精神活性物质进行分析。其中, Methylone 在其 1 号位的甲氨基末端增加 1 个—CH₃ 可以形成 Ethylone^[5], 4-CMC 在其 1 号位的甲氨基末端增加 1 个—CH₃ 可以形成 4-CEC, 4 种物质两两之间的分子结构差异小,相似度高,具有多个相同或相似的特征碎片离子,不易区分。在临床上, Methylone 作为抗抑郁和抗帕金森药物使用,目前采用离子迁移谱(IMS)结合超高效液相色谱-串联质谱法(UHPLC-MS/MS)^[6]、超高效液相色谱法(UHPLC)^[7]、高效液相色谱法(HPLC)^[8-9]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[10-11]、傅里叶变换红外光谱法(FTIR)和高分辨质谱法(HRMS)进行分析^[12]; Ethylone 已在国外滥用该类药物致死的案件中检出^[13],有报道用液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(LC-QTOF MS)鉴定 Methylone 和 Ethylone 在阳性死亡病例尸体中的含量分布^[14],用掺硼金刚石电极分析法^[13]、GC-MS 法^[15-16]对缴获的 Ethylone 进行分析; 4-CMC 是一种氯代卡西酮衍生物,报道中采用 GC-MS^[17-18]、HPLC-QTOF MS 和 UPLC-MS/MS 进行分析^[19-20]; 4-CEC 是近年新兴的娱乐产品,报道中采用气相色谱-电子电离质谱仪(GC-EI-MS)、液相色谱-二极管阵列检测器(LC-DAD)、气相色谱-化学电离质谱仪(GC-CI-MS)和 FTIR 对缴获的样品进行分析^[21],通过液相色谱-高分辨质谱法(LC-HRMS/MS)和 GC-MS 进行定性分析^[22]。

目前同时对 Methylone、Ethylone、4-CMC 和 4-CEC 进行定性定量分析的检测方法尚未见报道,因此建立快速、准确、同时检测这 4 种药物的方法具有重要的实际意义。本研究建立了超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UHPLC-QTOF MS/MS)同时检测血样中上述药物的方法,可为卡西酮类新精神活性物质的检测鉴定提供重要依据。

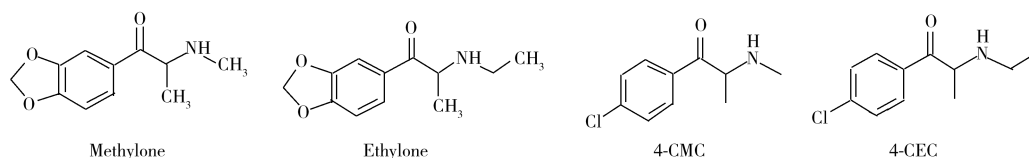


图 1 4 种目标药物的结构图

Fig. 1 Structure diagrams of four target drugs

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Vion[®] IMS QToF 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司); Vortex Genie-2 涡旋振荡器、Eppendorf Centrifuge 5810 R 离心机(美国科学产业公司)。

Methylone、Ethylone、4-CMC 和 4-CEC 均为 1.0 mg/mL 的标准储备液(上海市公安局物证鉴定中

心),保存于4℃冰箱中;甲醇、乙腈、甲酸、甲酸铵(HPLC级,上海安谱实验科技股份有限公司);纯水(ELGA纯水制作仪制备)。

1.2 混合标准溶液的配制

取Methylone、Ethylone、4-CMC和4-CEC(均为1.0 mg/mL的标准储备液)各100 μL于同一容量瓶中,加入600 μL乙腈定容配成100 μg/mL的混合标准样品储备液,保存于4℃冰箱中,根据需要甲用醇逐级稀释。

1.3 样品前处理

移取不同质量浓度的4种待测物质标准品溶液10 μL于10 mL离心管中,依次加入0.5 mL空白全血、0.2 mL纯水和1.3 mL乙腈,涡旋振荡1 min充分混匀后,于5℃以12 000 r/min离心15 min。用1 mL移液枪吸取上层液体置于进样瓶中,待检测。

1.4 实验条件

色谱条件:Acquity UPLC® BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),柱温为40℃。流动相:A为0.1%甲酸-水(5 mmol/L乙酸铵),B为乙腈;进样量:1 μL,流速:0.4 mL/min。梯度洗脱程序:0~1 min,5% B;1~5 min,5%~90% B;5~6 min,90% B;6~7 min,90%~5% B;7~8 min,5% B。总运行时间为8 min。

质谱条件:使用电喷雾电离(ESI)源,电喷雾电压为3 000 V,正离子[M+H]⁺扫描检测,在多反应监测(MRM)模式下,设置锥孔电压为40 V,毛细管电压为0.5 kV,离子源温度为120℃,脱溶剂气流速为800 L/h,脱溶剂气温度为550℃,锥孔气流速为50 L/h。每天对QTOF MS/MS进行校准。最佳质谱检测条件见表1。

表1 4种目标药物的质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters of 4 target drugs

| Compound | Retention time (min) | Precursor ion (<i>m/z</i>) | Daughter ions (<i>m/z</i>) | Cone voltage (V) | Collision energy (eV) |
|-----------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|--------------------------|
| Methylone | 2.31 | 208.096 82 | 190.085 85, 160.076 53* | 40 | 16 |
| Ethylone | 2.44 | 222.112 47 | 204.102 45, 174.091 72* | 40 | 16 |
| 4-CMC | 2.71 | 198.068 02 | 180.060 00, 145.090 00* | 40 | 16 |
| 4-CEC | 2.81 | 212.083 67 | 194.115 74*, 159.104 38 | 40 | 16 |

* quantitative ion

2 结果与讨论

2.1 前处理条件的优化

血样中含有红细胞、白细胞和血小板等,杂质较多,基质较为复杂,所以进行前处理时要考虑如何提高所提取目标物的纯净度,从而降低基质效应,同时保护仪器设备的使用寿命。有机溶剂沉淀蛋白法具有操作简便、分辨能力高、应用广泛等优点,本实验选用沉淀蛋白法,为缩短前处理时间且保证处理效果,分别考察了不同离心时间(10、15、20 min)和不同转速(10 000、12 000、14 000 r/min)下的前处理效果。结果表明,离心时间太短、转速太慢,上清液均会略微浑浊,杂质太多;离心时间太长、转速太快,会导致血样中细胞过度碎裂,上清液略呈红色且浑浊。实验选择离心时间为15 min,转速为12 000 r/min,此时前处理效果最为理想。

2.2 色谱条件的优化

本研究采用梯度洗脱程序,首先比较了流动相B的初始比例分别为5%和10%的情况(0~1 min,5% B;1~9 min,5%~90% B;9~10 min,90% B;10~11 min,90%~5% B;11~12 min,5% B和0~1 min,10% B;1~9 min,10%~90% B;9~10 min,90% B;10~11 min,90%~10% B;11~12 min,10% B),总运行时间为12 min。结果表明,流动相B的初始比例为5%时峰形更好。由于4种目标物的出峰时间均较短,为节省实验时间,将洗脱总运行时间从12 min调至8 min,即流动相B的比例从5%升至90%的时间减少4 min,加快变化速度后,4种目标药物的出峰时间变短,且峰形拖尾情

况有所改善。在“1.4”的最优梯度洗脱程序下,得到4种目标药物混合标准溶液的总离子色谱图(见图2)及MRM色谱图(见图3)。

2.3 质谱条件的优化

取4种目标药物100 ng/mL的单个标准品溶液,采用电喷雾电离,MRM模式进样分析,分别考察了正离子 $[M+H]^+$ 扫描模式和负离子扫描模式。结果表明,4种目标药物在正离子 $[M+H]^+$ 扫描模式下的响应强度均高于负离子扫描模式,所以选用正离子 $[M+H]^+$ 扫描检测。在预实验中考察了不同锥孔电压(30、40、50、60 V)的影响,结果表明锥孔电压为40 V时效果最好。为减少基质干扰,实现完全的基线分离和定性定量,考察了不同分辨率下的一级、二级质谱图,结果显示当分辨率 $\geq 30\,000$ 可以满足要求。优化的质谱条件如“1.4”所示。

2.4 基质效应、回收率与相对标准偏差

取9支离心管,3份为1组,共3组,依次加入0.5 mL空白全血、0.2 mL纯水和1.3 mL乙腈,得到洗脱液1.5 mL(处理方法参照“1.3”),再每组分别加入7.5 μL 高(200 ng/mL)、中(50 ng/mL)、低(5 ng/mL)质量浓度的混合标准溶液(甲醇配制),测得其色谱峰面积 S_1 ;另取9支离心管,3份为1组,共3组,分别加入1.5 mL乙腈,每组分别加入7.5 μL 高(200 ng/mL)、中(50 ng/mL)、低(5 ng/mL)质量浓度的混合标准溶液(甲醇配制),测得其色谱峰面积 S_2 。计算基质效应(ME): $ME = S_1/S_2 \times 100\%$ 。

按上述方法再取9支离心管,3份为1组,共3组,分别添加10 μL 高(200 ng/mL)、中(50 ng/mL)、低(5 ng/mL)质量浓度的混合标准溶液(甲醇配制),并依次加入0.5 mL空白全血、0.2 mL纯水和1.3 mL乙腈,按照“1.3”进行样品处理,测得峰面积 S_3 ,计算回收率:回收率 = $S_3/S_1 \times 100\%$ 。再取高(200 ng/mL)、中(50 ng/mL)、低(5 ng/mL)质量浓度的混合标准溶液平行样本各3份,按照“1.3”进行样品处理和“1.4”条件进样分析,每个浓度在第1 d重复进样5次,后连续4 d每天进样1次,得到峰面积,并计算日内和日间相对标准偏差(RSD)。在3种加标浓度下,4种目标药物的基质效应为86.9%~117%,处于正常范围内($\pm 20\%$),说明建立的校正曲线能够有效消除基质干扰;回收率为87.3%~111%,日内和日间RSD分别不大于8.1%和8.6%,准确度和重复性良好(见表2)。

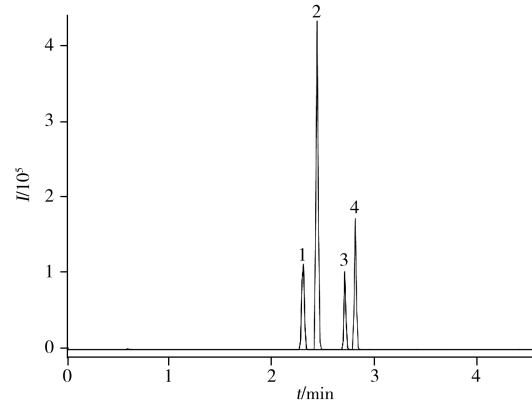


图2 4种目标药物混合标准溶液的总离子色谱图
Fig. 2 Total ion chromatogram of 4 target drugs mixed standard solution

1: methylone; 2: ethylone; 3: 4-CMC; 4: 4-CEC

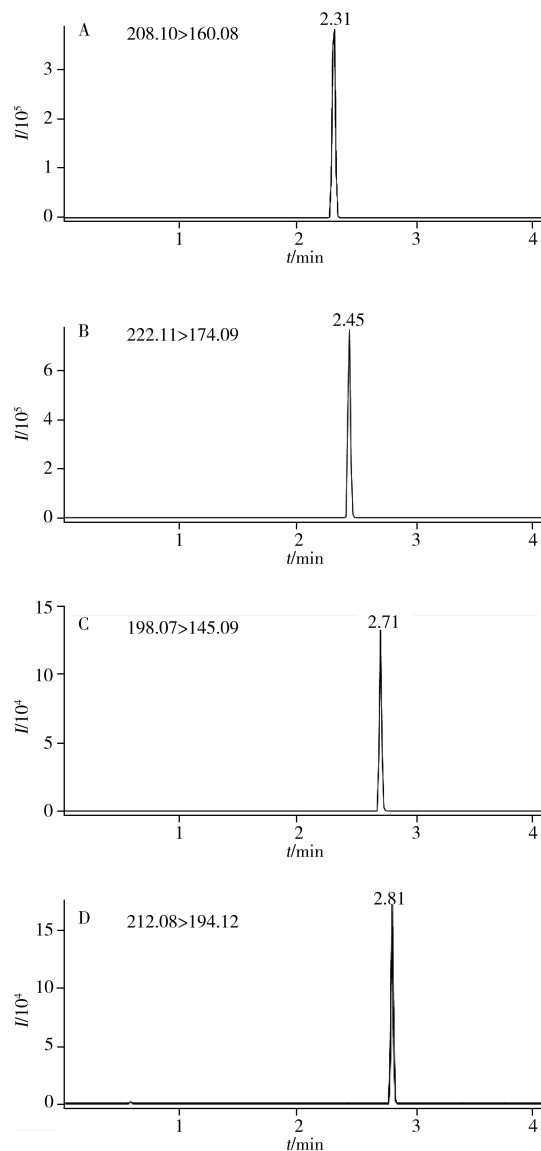


图3 4种目标药物的MRM色谱图

Fig. 3 MRM chromatograms of four target drugs
A: methylone; B: ethylone; C: 4-CMC; D: 4-CEC

表2 4种目标药物在血样中的基质效应、回收率和相对标准偏差
Table 2 Matrix effects, recoveries and relative standard deviations of 4 target drugs in blood samples

| Compound | Added (ng/mL) | ME (%) | Recovery (%) | Intra-day RSD (% , n = 5) | Inter-day RSD (% , n = 5) |
|-----------|---------------|--------|--------------|---------------------------|---------------------------|
| Methylone | 5 | 102 | 93.3 | 5.3 | 5.9 |
| | 50 | 101 | 95.7 | 8.1 | 7.8 |
| | 200 | 117 | 109 | 4.3 | 4.0 |
| Ethylone | 5 | 108 | 103 | 4.9 | 5.3 |
| | 50 | 106 | 95.8 | 6.5 | 6.7 |
| | 200 | 111 | 109 | 3.1 | 3.4 |
| 4-CMC | 5 | 91.3 | 92.0 | 6.7 | 6.3 |
| | 50 | 86.9 | 87.3 | 7.8 | 6.5 |
| | 200 | 94.9 | 108 | 6.5 | 5.6 |
| 4-CEC | 5 | 92.6 | 106 | 7.9 | 6.3 |
| | 50 | 91.8 | 92.8 | 7.0 | 7.3 |
| | 200 | 94.7 | 111 | 7.0 | 8.6 |

2.5 线性关系、检出限与定量下限

在1 mL空白血液中依次添加4种目标药物混合标准溶液,配得各目标药物质量浓度分别为5、10、50、100、200、500 ng/mL的混合标准工作溶液,按照“1.3”进行样品处理和“1.4”条件进样分析。选取权重为 $1/x^2$,以4种目标药物的峰面积(y)对其质量浓度(x , ng/mL)分别进行线性拟合。计算得到线性回归方程、线性范围、相关系数(r^2)、检出限(LOD,以 $S/N \geq 3$ 计)和定量下限(LOQ,以 $S/N \geq 10$ 计)(见表3)。由表3可知,4种目标药物在5~500 ng/mL质量浓度范围内线性关系良好,相关系数为0.999 0~0.999 5, LOD和LOQ分别为2 ng/mL和5 ng/mL。

表3 血样中4种目标药物的线性关系、检出限与定量下限
Table 3 Linear relationships, LODs and LOQs of 4 target drugs in blood samples

| Compound | Linear range (ng/mL) | Linear equation | r^2 | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) |
|-----------|----------------------|------------------------------|---------|-------------|-------------|
| Methylone | 5~500 | $y = 1\ 008.40x + 5\ 004.80$ | 0.999 4 | 2 | 5 |
| Ethylone | 5~500 | $y = 2\ 591.00x + 14\ 122.0$ | 0.999 0 | 2 | 5 |
| 4-CMC | 5~500 | $y = 548.710x + 298.460$ | 0.999 5 | 2 | 5 |
| 4-CEC | 5~500 | $y = 939.220x + 1\ 995.10$ | 0.999 3 | 2 | 5 |

y : peak area; x : mass concentration (ng/mL)

2.6 方法应用

为验证本方法的实用性,选取两只雄性小鼠a(体重103 g)和b(体重106 g)。向小鼠a投喂含50 mg/g 4种目标药物的食物,小鼠b作为空白对照。2 h后,取两只小鼠血液各0.5 mL,按“1.3”和“1.4”步骤进行分析,小鼠a的血液中检出Methylone、Ethylone、4-CMC和4-CEC的质量浓度分别为13.3、32.6、10.2、19.8 ng/mL;小鼠b的血液中未检测到4种目标药物。结果表明,本方法可以满足含有4种目标药物的血液检材的同时检测要求。

3 结论

本研究建立了血样中Methylone、Ethylone、4-CMC和4-CEC 4种卡西酮类新精神活性物质的UH-PLC-QTOF MS/MS检测方法。该方法能够筛查血样中的混合目标物,并同时定性、定量分析,可为法庭科学血液样本中多种此类新精神活性物质的同时检测提供重要依据。

参考文献:

- [1] Qian Z H, Jia W, Li T, Liu C M, Hua Z D. *Drug Test. Anal.*, **2017**, 9(2): 274-281.
- [2] Wood M R, Bernal I, Lalancette R A. *Acta Crystallogr. C*, **2016**, 72(1): 48-51.
- [3] Hill S L, Thomas S H. *Clin. Toxicol.*, **2011**, 49(8): 705-719.
- [4] Merola G, Fu H, Tagliaro F, Macchia T, Mccord B R. *Electrophoresis*, **2014**, 35(21/22): 3231-3241.
- [5] Wood Matthew R, Lalancette Roger A, Bernal I. *Acta Crystallogr. C*, **2015**, 71(1): 32-38.
- [6] Sorribes-Soriano A, Sánchez-Martínez S, Arráez-González R, Esteve-Turrillas F A, Armenta S. *Microchem. J.*, **2020**, 153: 104504.

- [7] Silva B, Silva R, Fernandes C, de Pinho P G, Remião F. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2020**, 395: 114970 – 114977.
- [8] Spálovská D, Maříková T, Kohout M, Králík F, Kuchař M, Setnická V. *Forensic Toxicol.*, **2019**, 37(2): 366 – 377.
- [9] Qian Z H, Jia W, Hua Z D. *Chin. J. Forensic Sci.* (钱振华, 贾薇, 花镇东. 中国司法鉴定), **2015**, (1): 23 – 26.
- [10] Araujo A M, Carvalho M, Bastos M D, Carvalho F, Pinho P G. *Arch. Toxicol.*, **2019**, 93 (11): 3277 – 3290.
- [11] Wang P, Liu X Y, Liu Y, Luo Y F, Wang Z. *J. Forensic Med.* (王平, 刘晓云, 刘遥, 罗叶锋, 王震. 法医学杂志), **2018**, 34(6): 606 – 610.
- [12] Zheng S Q, Wu Z P, Wang R, Ye H Y, Liang C, Wang W, Ni C F, Gong F J, Zhang R S. *Chin. J. Forensic Sci.* (郑水庆, 吴忠平, 汪蓉, 叶海英, 梁晨, 王威, 倪春芳, 龚飞君, 张润生. 中国司法鉴定), **2013**, (4): 28 – 31.
- [13] Scheel G L, de Oliveira F M, de Oliveira L L G, Medeiros R A, Nascentes C C, Tarley C R T. *Sens. Actuators B*, **2018**, 259: 1113 – 1122.
- [14] Glicksberg L, Winecker R, Miller C, Kerrigan S. *Forensic Toxicol.*, **2018**, 36(2): 291 – 303.
- [15] De Dios M, Monteagudo E, Trabsa A, Grifell M, Galindo L, Quintana P, Palma A, Ventura M, Sanagustin D, Pérez S, Torrens M. *Eur. Psychiatry*, **2017**, 41(25): S847 – S910.
- [16] Chad R M, Idraly Q A, Catherine R C, Cameron S T, Anthony L, Grossert S T. *Drug Test. Anal.*, **2016**, 8(8): 847 – 857.
- [17] Klavž J, Gorenjak M, Marinšek M. *Forensic Sci. Int.*, **2016**, 265: 121 – 124.
- [18] Ewa T, Kacper W M, Marzena K, Marek W, Beata S, Marek B. *Forensic Toxicol.*, **2018**, 36(2): 476 – 485.
- [19] Wiergowski M, Aszyk J, Kaliszan M, Wilczewska K, Anand J S, Kot – Wasik A, Jankowski Z. *J. Chromatogr. B*, **2017**, 1041: 1 – 10.
- [20] Nowak K, Paweł S, Zawadzki M. *Forensic Toxicol.*, **2019**, 37(1): 261 – 264.
- [21] Cheng W C, Wong W C. *Forensic Sci. Int.*, **2019**, 298: 268 – 277.
- [22] Wagemann L, Manier S K, Eckstein N, Maurer H H, Meyer M R. *Forensic Toxicol.*, **2020**, 38 (1): 59 – 69.

(责任编辑: 丁 岩)