

使用 μ Elution混合型SPE结合UPLC/MS/MS检测技术对尿液中的“浴盐”化合物进行法医毒理学分析

Jonathan P. Danaceau, Erin E. Chambers and Kenneth J. Fountain
沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德）

应用优势

- 快速，通用的提取方法分析尿液中的合成卡西酮及代谢物
- 对所有分析物和代谢物均有线性响应
- 大多数分析物的回收率在90%以上
- 所有化合物的基质效应低于15%
- 对质谱图相同的异构体可达到基线分离
- 无需蒸发或复溶步骤即可获得最终洗脱物

沃特世解决方案

Oasis® MCX μ Elution板

96孔板

ACQUITY UPLC® BEH色谱柱

ACQUITY UPLC系统

Xevo® TQD质谱仪

关键词

浴盐，卡西酮，UPLC®，法医毒理学，SPE

简介

合成卡西酮是化学品卡西酮的类似物，它们常作为“浴盐”在市场上出售。卡西酮天然存在于卡塔叶植物（阿拉伯茶）中。这一类药物是中枢神经系统兴奋剂，其药效可模拟安非他命、甲基苯丙胺、可卡因和哌醋甲酯等药物。虽然这类药物通常被注明“不适于人类使用”，但在过去几年里它们在人群中的接受和使用程度有着明显增长¹。此外，人们正在通过修饰现有卡西酮结构不断开发并推广新药，以规避为特定化合物设定的药物滥用法规。本应用纪要详细介绍了一种成功提取和分析人体尿液样品中多种代表性合成卡西酮的法医毒理学方法。通过使用混合型固相萃取（SPE），再进行UPLC/MS/MS分析，由10种合成卡西酮组成的一组化合物被成功提取，并获得了高回收率和分析灵敏度。所有化合物的基质效应都很小，并且校准曲线在1至500 ng/mL范围内呈线性。对上述各类药物的分析使得此方法能够拓展于新开发的相关化合物，必要时也可对该方法作出适当的调整。

实验

方法条件

LC条件

系统:	ACQUITY UPLC
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 1.7 μm, 2.1 × 100 mm (部件号186002352)
柱温:	30 °C
进样体积:	10 μL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸的MilliQ水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度:	流动相B在20%的初始条件下保持0.5 min, 在2 min内增加至30%, 然后在0.1 min内返回至20%。重新平衡系统1.4 min。整个循环时间为4.0 min
样品瓶/板:	96孔样品收集板, 700 μL (部件号186005837)

MS条件

质谱仪:	Xevo TQD
电离模式:	ESI+
采集模式:	MRM (请参阅表1中的离子通道)
毛细管电压:	1 kV
碰撞能量 (eV):	针对具体化合物进行优化 (参阅表1)
锥孔电压 (V):	针对具体化合物进行优化 (参阅表1)

数据管理

使用Waters® MassLynx®软件采集和分析所有数据

材料

4-甲基甲卡西酮 (甲氧麻黄酮, 4-MMC)、3, 4-亚甲二氧基-N-甲基卡西酮 (甲基酮) 和亚甲基二氧吡咯戊酮 (MDPV) 均购自Cerilliant (德克萨斯州圆石)。所有其它化合物和代谢物购自Cayman Chemical (密歇根州安阿伯)。

所有化合物的混合储液 (5 μg/mL) 由甲醇配制。工作溶液需每天使用使用基质 (尿液) 配制的标准品制备, 并进行连续稀释以得到所需浓度。所有分析物的校准浓度范围为5-500 ng/mL。

本文中所分析的10种化合物列于表1中, 构成了一组包含法医毒理学相关卡西酮的化合物, 如吡咯烷基苯酮 (α-PPP, α-PVP)、亚甲二氧基卡西酮 (甲基酮, 乙基酮) 和甲氧基甲基卡西酮 (甲氧非君)。所有这些化合物为中等疏水性的弱碱性物质, 非常适合采用混合型离子交换进行提取。所有化合物的锥孔电压、MRM通道和各自的碰撞能量列于表1中。

样品制备

采用混合型强阳离子SPE提取样品。向每份样品, 即100 μL尿液中加入等体积的4% H₃PO₄进行预处理。先用200 μL甲醇平衡Oasis MCX μElution 96孔板 (部件号186001830BA) 中的各个孔, 然后用200 μL MilliQ水平衡。取每份稀释样品200 μL加入各孔中, 使得载样量为100 μL尿液。完成上样后, 依次用200 μL 2%甲酸水溶液, 200 μL甲醇清洗各孔。然后, 用含5%浓NH₄OH溶液 (Fisher, 20%-22%) 的50 μL 60:40 ACN/IPA洗脱所有样品, 洗脱两次。加5 μL浓甲酸中和样品, 并用100 μL水进行稀释。取10 μL注入LC/MS/MS系统。

基质效应按照以下公式计算:

$$\text{基质效应} = \left(\left(\frac{\text{基质存在时的峰面积}}{\text{无基质时的峰面积}} \right) - 1 \right) \times 100\%$$

结果与讨论

色谱

所有化合物通过50 ng/mL校准标准品获得的代表性色谱图如图1所示。谱峰分配列于表1中。采用ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 1.7 μm, 2.1 × 100 mm色谱柱在2 min内完成所有化合物的分析，总循环时间为4 min。乙基酮和丁基酮（峰2和6）为一对同分异构体，其母离子和产物离子相同，尽管分析时间较短，二者仍实现了基线分离，而这种明确的分离结果在两种化合物共流出时是无法实现的。所有化合物的峰形良好，无明显的拖尾或不称，且所有峰宽小于4 s。

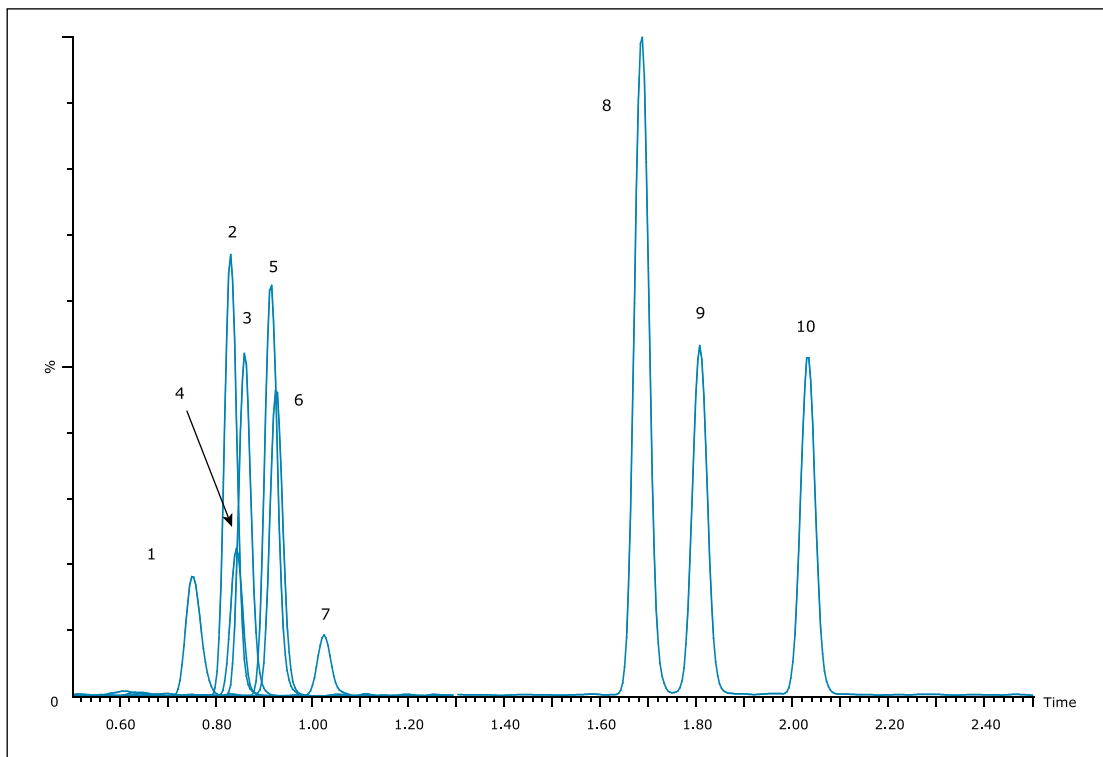


图1. 10种“浴盐”化合物的UPLC/MS/MS色谱图。谱峰分配列于表1中。

药物	替代名称	保留时间	分子式	质量数	锥孔电压	MRM通道	碰撞能量	
1	甲基酮	3,4-亚甲二氧基-N-甲基卡西酮	0.75	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	207.23	28 28	208.2→132.0 208.2→160.0	28 18
2	乙基酮	MDEC, bk-MDEA	0.83	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221.26	30 30	222.3→174.1 222.3→204.1	20 14
3	甲氧非君	4-甲氧基甲基卡西酮	0.84	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193.25	28 28	194.2→161.0 194.2→146.0	22 30
4	α-PPP	α-吡咯烷基苯丙酮	0.86	C ₁₃ H ₁₇ NO	203.28	42 42	204.3→105.0 204.3→98.0	24 28
5	MDPPP	3',4'-亚甲二氧基-α-吡咯烷基苯丙酮	0.92	C ₁₄ H ₁₇ NO ₃	247.29	42 42	248.3→98.0 248.3→147.0	26 24
6	丁基酮	Bk-MBDB	0.92	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221.26	32 32	222.3→174.1 222.3→204.1	18 15
7	甲氧麻黄酮	4-甲基甲卡西酮, 4-MMC	1.02	C ₁₁ H ₁₅ NO	177.24	26 26	178.2→145.0 178.2→91.0	22 34
8	α-PVP	α-吡咯烷基苯基戊酮	1.66	C ₁₅ H ₂₁ NO	231.34	38 38	232.4→91.0 232.4→105.0	26 28
9	MDPV	亚甲基二氧吡咯戊酮	1.78	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	275.35	38 38	276.4→175.0 276.4→205.0	22 20
10	α-PVP Met 1	α-吡咯烷基苯基戊酮代谢物1	2.00	C ₁₅ H ₂₃ NO	233.35	30 30	234.4→72.0 234.4→173.0	20 24

表1. 卡西酮化合物的MS/MS条件和保留时间。

回收率和基质效应

在此应用中，最初采用含5%浓NH₄OH的60:40 ACN/MeOH溶液经Oasis MCX μElution板进行洗脱。大多数化合物的回收率良好，平均值大约为80%。但是，α-PVP羟基代谢物的回收率仅为40%。此外，许多被测化合物出现显著的基质效应（以离子抑制的形式为主），尤其是最早洗脱的三种化合物甲基酮、乙基酮和甲氧非君。用水代替洗脱溶剂甲醇后未发现基质效应降低，并且α-PVP羟基代谢物的回收率降低为4%。然而，当使用异丙醇（IPA）代替甲醇时，α-PVP羟基代谢物的回收率增加至87.4%，其它9种分析物的回收率平均值从81%增加至近98%。此外，所有化合物的基质效应几乎都被消除。图2汇总了采用上述提取方法所得到的回收率和基质效应。回收率范围为87.4%至100.5%，基质效应范围为-3.6%至12.4%，其平均值为6.2%。被测化合物经上述方法提取后，几乎得到完全回收，并且基质效应极小。

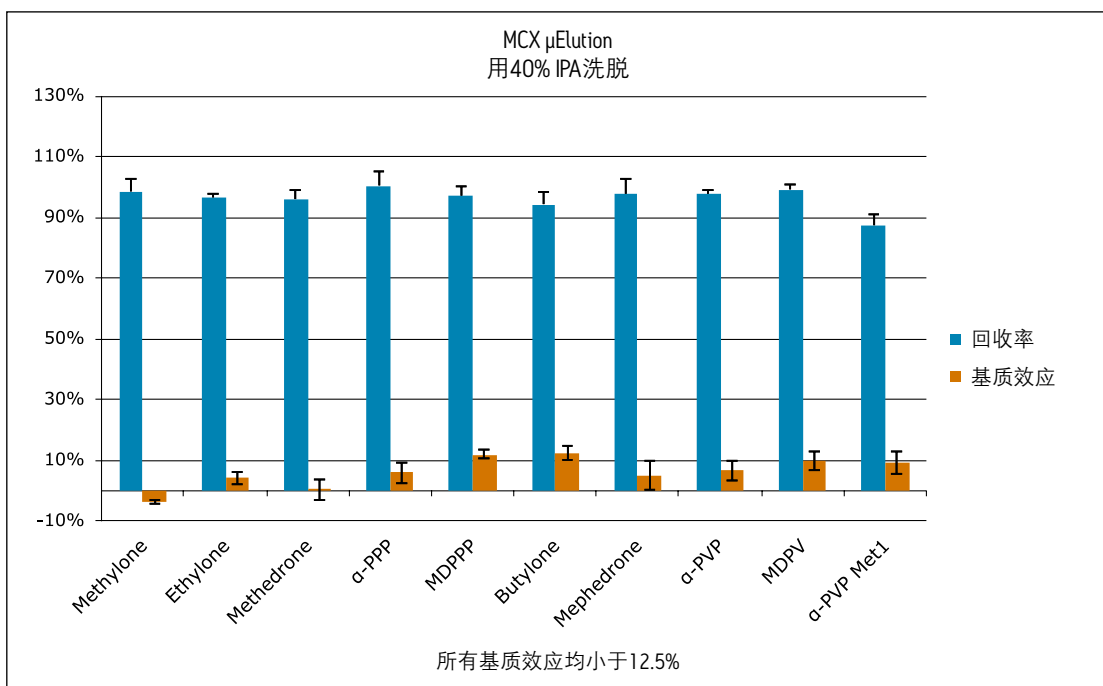


图2. 使用MCX μElution板进行SPE操作后从尿液中提取的“浴盐”化合物的回收率和基质效应。图中的条柱和误差条柱分别表示平均值和标准偏差 (N=4)。

线性和灵敏度

为了评估分析方法的线性和灵敏度，我们为所有组分建立了浓度范围为1至500 ng/mL的校准曲线。表2汇总了所有化合物的R²值以及与标准值的平均偏差（N=3）。除α-PVP代谢物在10 ng/mL的校准点之外，几乎所有校准点都在其目标值的15%范围之内。尿液样品提取物浓度为1 ng/mL时，其所有化合物的峰面积至少高于空白时的5倍，且均在额定值的5%范围之内。

	浓度 (ng/mL)						R ²
	1	5	10	50	100	500	
甲基酮	-3.80	9.85	10.13	2.83	-7.43	-15.87	0.990
乙基酮	-2.60	8.13	10.43	2.20	-8.37	-9.80	0.990
甲氧非君	-3.80	9.85	10.13	2.83	-7.43	-15.87	0.987
α-PPP	-1.37	4.33	5.67	-0.40	-6.80	-1.43	0.997
MDPPP	-1.70	7.33	3.30	-0.93	-6.53	-1.43	0.996
丁基酮	-2.07	8.90	13.85	2.47	-6.13	-9.43	0.989
甲氧麻黄酮	-1.53	7.90	5.23	1.60	-6.33	-4.20	0.994
α-PVP	-1.70	4.60	8.20	-3.80	-9.27	0.80	0.994
MDPV	-1.20	3.60	3.20	-1.37	-9.23	2.33	0.997
α-PVP代谢物1	4.15	-9.60	-30.70	-4.97	9.47	11.07	0.983

表中的值代表与标准值之间的偏差%

表2. “浴盐”化合物校准曲线的标准曲线点准确度和R²值。

结论

我们采用混合型SPE从尿液中提取了一组由10种合成卡西酮药物组成的化合物，并利用UPLC/MS/MS进行了分析。Waters MCX μ Elution板的使用为所有分析物提供了良好的回收率，且基质效应极小。此外，提取过程中无需蒸发或复溶步骤，从而节省了时间并消除了这些步骤所伴随的蒸发或吸附带来的样品损失风险。UPLC分离方法能够在2 min内对所有化合物的同分异构体达到基线分离。校准曲线在1至500 ng/mL的浓度范围内呈线性，并且所有化合物的定量限为1 ng/mL。本方法能够快速、可靠地提取和分析这类法医毒理学重要化合物。

参考文献

1. Coppola M, Mondola R. Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as "bath salts" or "plant food." *Toxicology Letters*. 2012; 211(2): 144-149.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, Oasis, ACQUITY UPLC, Xevo, ACQUITY, UPLC和MassLynx是沃特世公司的注册商标。The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 年沃特世公司。印制于中国。2013年6月 720004708ZH LL-PDF

沃特世中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com