

高效液相色谱-串联质谱法检测血液中 甲卡西酮及其代谢物卡西酮

刘冬娴¹, 张旭东², 赵明明¹, 贺江南¹

(1. 湖南警察学院刑事科学技术系, 湖南 长沙 410138;

2. 长沙市公安局禁毒支队, 湖南 长沙 410000)

摘要:建立了高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法检测血液中甲卡西酮及其代谢物卡西酮。用双苯戊二氨酯(SKF_{525A})的乙腈溶液提取含甲卡西酮及卡西酮的血液样品,提取液过0.22 μm微孔有机滤膜后,进行HPLC-MS/MS检测。采用Column Eclipse Plus C18色谱柱分离,柱温45℃,以0.1%甲酸水溶液和乙腈为流动相进行梯度洗脱;电喷雾离子源(ESI)正离子多反应监测模式(MRM)检测。结果表明,甲卡西酮在0.2~2 000 μg/L浓度范围内线性关系良好($r=0.999$),日内精密度低于7.9%,日间精密度低于8.8%;卡西酮在0.5~2 000 μg/L浓度范围内线性关系良好($r=0.999$),日内精密度低于8.2%,日间精密度低于9.1%。该方法操作简便、检测灵敏度高、专一性强、线性范围宽,可用于血液中甲卡西酮及其代谢物卡西酮的检测。

关键词:法医毒物;高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS);血液;甲卡西酮;卡西酮

中图分类号:O657.6

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2019)06-0584-07

doi:10.7538/zpxb.2019.0043

Determination of Methcathinone and Cathinone in Blood by HPLC-MS/MS

LIU Dong-xian¹, ZHANG Xu-dong², ZHAO Ming-ming¹, HE Jiang-nan¹

(1. Criminal Technology Department, Hunan Police Academy, Changsha 410138, China;

2. Narcotics Detachment, Changsha Public Security Bureau, Changsha 410000, China)

Abstract: A method of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was established for the detection of methcathinone and its metabolite cathinone. Methcathinone was administered to rabbits by intravenous injection and gavage respectively. The blood of poisoned rabbits was collected at 1, 2, 4, 6 and 8 h after the administration. Then, the blood samples were extracted by internal standard proadifen hydrochloride (SKF_{525A})-acetonitrile solution, and the extract was filtered with 0.22 μm organic filter membrane and detected by HPLC-MS/MS. The Column Eclipse Plus C18 chromatographic column (100 mm×3 mm×1.8 μm) was adopted and

收稿日期:2019-04-03;修回日期:2019-06-04

基金项目:湖南省自然科学基金项目(2018JJ2019);湖南省教育厅科学研究重点项目(15A057)资助

作者简介:刘冬娴(1963—),女(汉族),湖南宁乡人,教授,从事理化检验教学与研究。E-mail: liudongxian@aliyun.com

the column temperature was 45 °C, mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile. The results of the rabbit experiment showed that after intravenous injection and gavage of methcathinone, the blood levels of methcathinone and its metabolite cathinone reached the peak within 1 h, and then gradually decreased. The peak value of methcathinone in the blood of intravenous administration was much higher than that of intragastric administration, while the peak value of metabolite cathinone was not significantly affected by the administration method. In addition, the elimination rate of methcathinone and its metabolite in blood of intravenous administration was significantly higher than that of gavage administration, and the content of methcathinone in blood 8 h after intravenous administration was lower than the detection limit. The linear relationship of methcathinone was good in the range of 0.2-2 000 µg/L, and the linear equation was $y=0.014\ 1x+0.140\ 6$ ($r=0.999$). The detection limit was 0.1 µg/L, the average recovery was 90.5%-98.5% in the concentration range of 0.5-500 µg/L. The intra-day RSD was 5.9%-7.9% and the inter-day RSD was 6.6%-8.8%. The linear relationship of cathinone was good in the range of 0.5-2 000 µg/L, and the linear equation was $y=0.007\ 1x-0.023\ 1$ ($r=0.999$), the detection limit was 0.2 µg/L, the average recovery was 90.2%-97.6% in the concentration range of 0.5-500 µg/L. The intra-day RSD was 5.7%-8.2% and the inter-day RSD was 6.5%-9.1%. The method is simple and sensitive, and can be used to detect methoxyketone and its metabolite in blood samples.

Key words: forensic toxicology; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); blood; methcathinone; cathinone

甲卡西酮又称“丧尸剂”、“浴盐”、“丧尸药”等,有强烈的兴奋及致幻作用。滥用甲卡西酮会出现幻觉、鼻灼伤、恶心、呕吐等症状,能够造成高度的心理成瘾,属国家管制的第一类精神药品。甲卡西酮进入生物体内产生的主要代谢产物为N位去甲基形成卡西酮^[1]。甲卡西酮和卡西酮的化学结构示于图1。

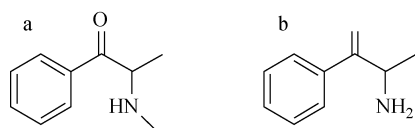


图1 甲卡西酮(a)和卡西酮(b)的结构式
Fig.1 Structures of methcathinone (a) and cathinone (b)

在我国山西、广东、黑龙江等地,甲卡西酮滥用的形势严峻^[2],现已成为司法鉴定中常见的分析目标物之一。目前,检测甲卡西酮的方法主要有非生物样品的液相色谱法(LC)^[3]、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[4-5]及气相色谱-质谱法(GC/MS)^[6-7]等,主要对禁毒实践中

查获的疑似毒品甲卡西酮进行定性、定量分析。有报道利用GC/MS检测血液^[8]、尿液^[9-11]中甲卡西酮,其中GC/MS法检测血液中甲卡西酮定量限为0.1 mg/L,未涉及代谢物卡西酮的检测;Sørensen^[12]建立了LC-ESI-MS/MS法测定血样中卡西酮、甲卡西酮等10多种毒品成分,检出限分别为1.4、2.0 µg/L;Swortwood等^[13]建立了LC-QQQ-MS/MS法检测血清中甲卡西酮及其衍生物,定量限为10 µg/L,线性范围为10~250 µg/L;Zhang等^[14]建立了UPLC-MS/MS法检测全血和尿液中安非他命、甲卡西酮等12种毒品成分,采用Oasis MCX柱进行固相萃取,萃取前样品经稀盐酸预处理,上清液过柱,之后依次用稀盐酸、甲醇、氨水洗柱,用5%氨水甲醇溶液洗脱,血液中甲卡西酮、卡西酮的线性范围分别为0.1~10、0.5~50 µg/L。

本研究拟建立HPLC-MS/MS法检测血液中甲卡西酮及其代谢物卡西酮,并应用该方法测定中毒家兔血液中甲卡西酮及卡西酮的含量。

1 实验部分

1.1 仪器与设备

Agilent 1290/6470A HPLC-MS/MS 液相色谱-质谱联用仪; 美国 Agilent 公司产品; TG16-WS 台式高速离心机: 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司产品; BSM-3200.2 电子天平: 上海卓精电子科技有限公司产品。

1.2 材料与试剂

1 g/L 甲卡西酮、卡西酮标准储备液: 由公安部禁毒局国家毒品实验室提供, 使用前用甲醇稀释成所需浓度的标准工作液; 盐酸 SKF_{525A} (双苯戊二氨酯, 纯度 95%): Sigma-Aldrich 公司产品, 称取 11.61 mg 盐酸 SKF_{525A} (折合 10.00 mg SKF_{525A}) 溶于 10 mL 甲醇中, 配制成 0.1 g/L 标准工作液; 含 50 μg/L 内标 SKF_{525A} 的乙腈溶液的制备: 准确吸取 125 μL 0.1 g/L SKF_{525A} 内标溶液于 250 mL 容量瓶中, 加入 50 mL 乙腈, 混匀, 用乙腈定容至刻度, 置于 4 °C 冰箱冷藏; 乙腈、甲醇、甲酸: 均为色谱纯; 空白血液: 健康、正常人体近期末服用

过药物的新鲜血液; 实验用水: 去离子纯净水; 一次性真空采血管(枸缘酸钠 1 : 9): 山东省成武县医用制品厂产品; 实验家兔(许可证号 SCXK(湘)2015-0004): 购于湖南太平生物科技有限公司。

1.3 仪器条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Column Eclipse Plus C18 柱(100 mm×3 mm×1.8 μm); 柱温 45 °C; 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0~3 min(95%~90% A), 3~4 min(90%~40% A), 4~5 min(40%~5% A), 5~9 min(5%~95% A), 9~10 min(95% A); 流速 0.3 mL/min; 进样量 1 μL。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源, 正离子模式 (ESI⁺); 离子源温度: 350 °C; 喷雾电压: 3.5 kV; 检测方式: 多反应监测模式 (MRM); 每个化合物分别选择两个离子对作为定性离子对, 其定性离子对、定量离子对、碰撞能量和保留时间列于表 1。

表 1 卡西酮、甲卡西酮和 SKF_{525A} 的定性离子对、碰撞能量和保留时间

Table 1 Qualitative ion pair, collision energy and retention time of cathinone, methcathinone and SKF_{525A}

化合物 Compounds	定性离子对 Qualitative ion pairs (<i>m/z</i>)	裂解电压 Fragmentation voltage/V	碰撞能量 Collision energy/eV	保留时间 Retention time/min
卡西酮	150.1/117.0*	80	30	4.535
	150.1/132.1		12	
甲卡西酮	164.1/130	80	34	5.144
	164.1/146.1*		10	
SKF _{525A}	354.2/167.1*	130	30	5.743
	354.2/209.1		21	

注: * 为定量离子对

1.4 检材处理

取 1 mL 待检血液于 10 mL 离心管中, 加入 2 mL 含 50 μg/L 内标 SKF_{525A} 的乙腈溶液, 涡旋混匀 5 min, 振荡提取 20 min, 以 8 000 r/min 离心 15 min, 分离上清液, 过 0.22 μm 微孔有机滤膜于 1.5 mL 样品瓶中, 供 LC-MS/MS 分析, 采用内标法-标准曲线法定量分析。

1.5 动物实验

取 8 只质量为 (2.0±0.2) kg 的家兔, 雌雄不限, 分为 4 组: 第 1 组 3 只, 分别编号 T2101、T2102、T2103; 第 2 组 1 只(空白对照组), 编号 T2100; 第 3 组 3 只, 分别编号 T2401、T2402、T2403; 第 4 组 1 只(空白对照组), 编号 T2400。按家兔质量, 以 20 mg/kg 剂量, 第 1

组静脉注射 10 g/L 甲卡西酮氯化钠溶液,第 2 组静脉注射氯化钠溶液,第 3 组灌胃 10 g/L 甲卡西酮氯化钠溶液,第 4 组灌胃氯化钠溶液。分别于给药后 1、2、4、6、8 h 采集各组家兔的耳根静脉血,按 1.4 节方法进行检材处理,按 1.3 节方法进行 LC-MS/MS 检测。

2 结果与讨论

2.1 内标物的选择

检测结果的准确性受样品前处理过程及检测方法定量重复性的影响,本研究采用添加内标法消除这些影响,考察了 SKF_{525A} 作为内标物的提取行为及色谱行为。结果表明,SKF_{525A} 提取回收率稳定,血液中添加 50 μg/L 内标物,其提取回收率可达 95.49% (RSD 为 5.0%, $n=6$),与检测目标物提取回收率同步;其色谱保留时间与分析目标物较接近,且对目标物无干扰,故选择 SKF_{525A} 作为内标物。

2.2 色谱分离

按 1.4 节方法对空白血液及添加卡西酮 (10 g/L)、甲卡西酮 (10 g/L) 的空白血液进行检材处理,LC-MS/MS 法检测,空白血液的总离子流图示于图 2,血液添加样品总离子流图及 MRM 色谱图示于图 3。在该实验条件下,卡西酮、甲卡西酮、SKF_{525A} 都得到分离,保留时间分别为 4.604、5.175、5.735 min,检材中内源性杂质对检测目标物无干扰。

中,涡旋 5 min,分别配制成含 0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50、100、200、500、1 000、2 000 g/L 甲卡西酮、卡西酮的血液样品。血液样品按 1.4 节方法处理,LC-MS/MS 法检测,以甲卡西酮、卡西酮与 SKF_{525A} 色谱峰面积之

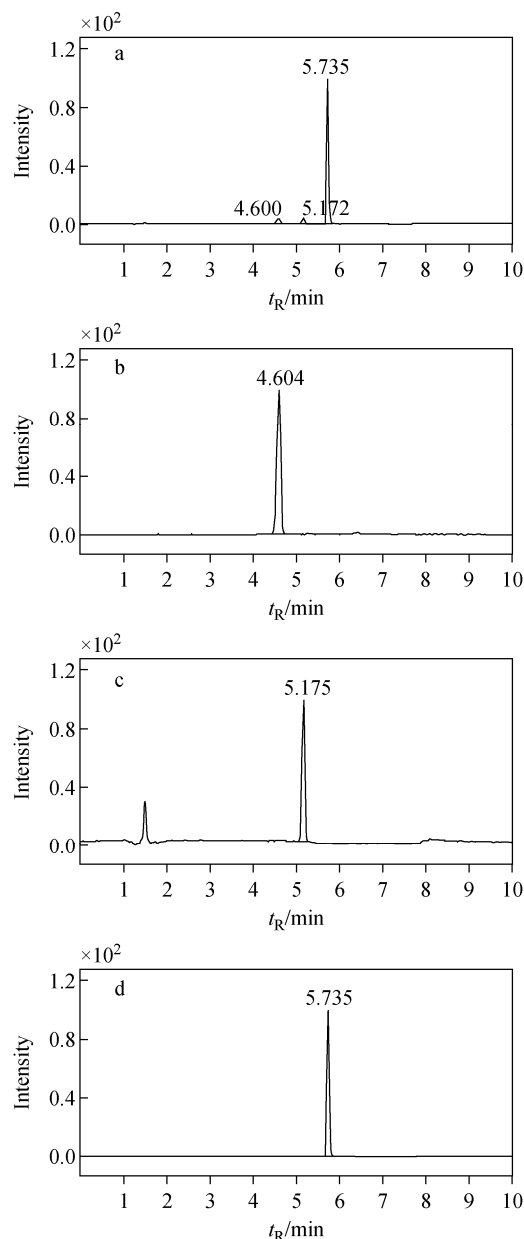


图 3 空白血液添加卡西酮和甲卡西酮的总离子流图(a)及卡西酮(b)、甲卡西酮(c)、SKF_{525A} (d)的 MRM 色谱图

Fig.3 TIC chromatogram of blank blood added with cathinone and methcathinone (a), MRM chromatograms of cathinone (b), methcathinone (c) and SKF_{525A} (d)

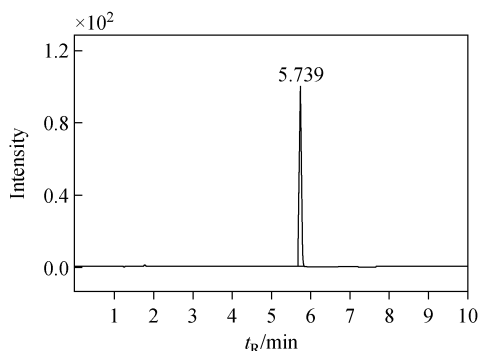


图 2 空白血液总离子流图

Fig.2 TIC chromatogram of blank blood

2.3 回归方程与线性范围

取适量的 100.0 mg/L 甲卡西酮、卡西酮标准工作液,用甲醇逐级稀释,添加到空白血液

比为 y ,以甲卡西酮、卡西酮浓度为 $x(\text{g/L})$ 进行线性回归。结果表明,甲卡西酮在 $0.2 \sim 2\,000\,\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,线性方程为 $y=0.014\,1x+0.140\,6(r=0.999)$;卡西酮在 $0.5 \sim 2\,000\,\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,线性方程为 $y=0.007\,1x-0.023\,1(r=0.999)$ 。

分别以 3 倍和 10 倍信噪比确定检出限和定量限,甲卡西酮检出限为 $0.1\,\mu\text{g/L}$ 、定量限为 $0.2\,\mu\text{g/L}$;卡西酮检出限为 $0.2\,\mu\text{g/L}$ 、定量限为 $0.5\,\mu\text{g/L}$,其 MRM 色谱图示于图 4。

2.4 回收率及精密度

取适量的空白血液,按 2.3 节方法分别配制含 0.5 、 5 、 50 、 $500\,\mu\text{g/L}$ 甲卡西酮、卡西酮的质量控制样品各 5 份,按照回归方程计算质量控制样品中甲卡西酮、卡西酮的含量,以质控样品中甲卡西酮、卡西酮的浓度与添加甲卡西酮、卡西酮浓度之比计算回收率,对 4 个浓度的血液样品同日内重复测定 6 次计算日内精密度,5 日内重复测定 5 次计算日间精密度,结果列于表 3。

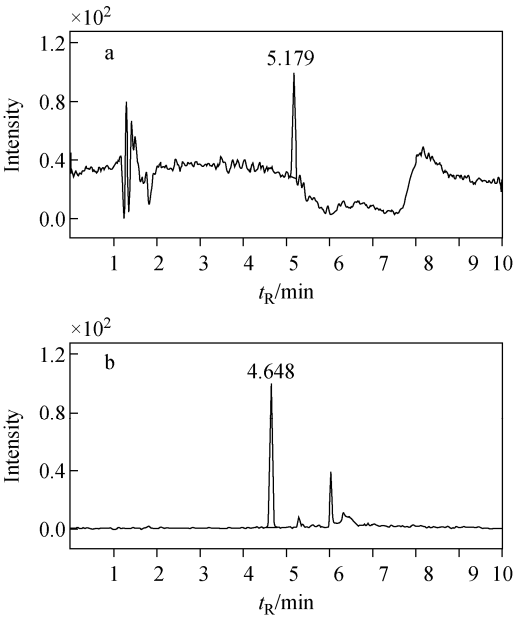


图 4 甲卡西酮(a)、卡西酮(b)的定量限 MRM 色谱图
Fig. 4 MRM chromatograms of LOQ of methcathinone (a) and cathinone (b)

表 3 添加回收率及精密度

Table 3 Recoveries and precision of this method

分析物 Analytes	添加量 Added concentration/($\mu\text{g/L}$)	回收率 Recoveries/%	日内精密度 Intra-day RSD/%	日间精密度 Inter-day RSD/%
甲卡西酮	0.5	90.5	7.9	8.8
	5	92.9	6.5	7.8
	50	95.2	6.1	6.9
	500	98.5	5.9	6.6
卡西酮	0.5	90.2	8.2	9.1
	5	93.8	7.5	8.2
	50	95.5	5.8	6.9
	500	97.6	5.7	6.5

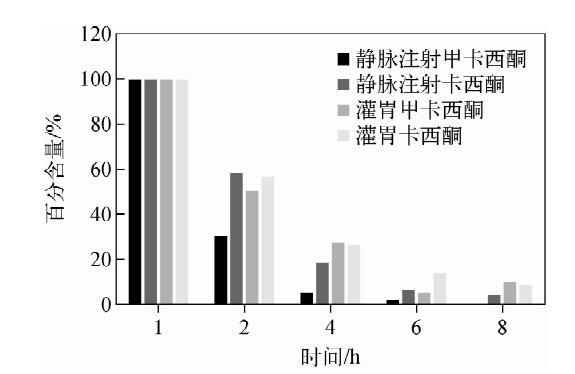
2.5 家兔血液样品的测定

按 1.4 节方法和 1.3 节条件对家兔血液样品进行处理及检测,依据血液样品中甲卡西酮及其代谢物卡西酮含量检测结果分析其代谢规律,结果示于图 5。

由图可见,家兔经静脉注射、灌胃方式给药甲卡西酮后,血液中甲卡西酮及其代谢物卡西酮均在 1 h 达到峰值。静脉注射给药后血液中甲卡西酮峰值远高于灌胃,代谢物卡西酮峰值

受给药方式影响不明显,可能是静脉注射甲卡西酮可以直接进入血液循环。静脉注射给药 6 h 后,血液中甲卡西酮含量降低至峰值的 $0.0\% \sim 1.6\%$,8 h 后低于检出限,卡西酮含量降低至峰值的 $2.6\% \sim 8.3\%$;灌胃给药 8 h 后血液中甲卡西酮含量降低至峰值的 $0.8\% \sim 22.5\%$,卡西酮含量降低至峰值的 $6.8\% \sim 13.7\%$ 。静脉注射给药方式血液中甲卡西酮及其代谢物卡西酮消除速率明显高于灌胃给药方

式。编号 T2403 在灌胃给药 6 h 后,血液中甲卡西酮含量降低至峰值的 4.9%,8 h 后甲卡西酮含量上升至峰值的 22.5%。二次峰值是个体差异所致还是其他原因则有待进一步研究。此外,给药 0~1 h 后是否存在峰值、8 h 后代谢规律如何、给药剂量对代谢规律的影响等问题也有待进一步研究。



注:空白对照组 T2100、T2400 在 1、2、4、6、8 h 血液样品中均未检出甲卡西酮及其代谢物卡西酮

图 5 家兔体内甲卡西酮代谢规律
Fig. 5 Metabolism rule of methcathinone in rabbits

3 结论

本研究建立了 LC-MS/MS 法测定血液中甲卡西酮、卡西酮,应用该方法对实验动物血液进行检测,并推测了甲卡西酮的代谢规律。该方法操作简便、检测灵敏度高,可用于血液样品中甲卡西酮、卡西酮的测定。

参考文献:

[1] 刘冬娴,王东生,贺江南. 血液中甲卡西酮法医学检测方法的建立及应用[J]. 中南药学,2018,16(10):1 433-1 436.
LIU Dongxian, WANG Dongsheng, HE Jiangnan. Development of forensic method for determination of methcathinone in blood and its application[J]. Central South Pharmacy, 2018, 16 (10): 1 433-1 436(in Chinese).
[2] 殷海博,张峰,李丽中,苏贵生,史庆国,贾志刚,王立勋,杨波,张卓. 长治地区 261 例甲卡西酮药物滥用调查[J]. 医学导报,2018,37(6):776-779.
YIN Haibo, ZHANG Feng, LI Lizhong, SU Guisheng, SHI Qingguo, JIA Zhigang, WANG Lixun, YANG Bo, ZHANG Zhuo. Survey data

of methcathinone abuse in 261 cases of Changzhi District[J]. Herald of Medicine, 2018, 37(6): 776-779(in Chinese).
[3] 常颖,徐鹏,高利生. 甲卡西酮的液相色谱法测定[J]. 化学分析计量,2012,21(1):67-69.
CHANG Ying, XU Peng, GAO Lisheng. Detection of methcathinone by HPLC[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2012, 21(1): 67-69(in Chinese).
[4] 常颖,高利生. 卡西酮、甲卡西酮和 4-甲基甲卡西酮的 LC-MS/MS 分析方法的研究[J]. 刑事技术,2014(1):29-30.
CHANG Ying, GAO Lisheng. Qualitative and quantitative analysis of cathinone, methcathinone and mephedrone by LC-MS/MS[J]. Forensic Science and Technology, 2014(1): 29-30(in Chinese).
[5] 常颖,张春水,高利生. 甲卡西酮的 LC-MS/MS 定性定量分析方法[J]. 化学分析计量,2013,22(3):51-53.
CHANG Ying, ZHANG Chunshui, GAO Lisheng. Qualitative and quantitative analysis of methcathinone by LC-MS/MS method[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2013, 22(3): 51-53(in Chinese).
[6] 尚世杰,郭灵军. 气相色谱-质谱法检测甲卡西酮及意义[J]. 河南科技大学学报:医学版,2012,30(4):275-276.
SHANG Shijie, GUO Lingjun. Detection of mecheathinone and its significance by gas chromatography mass spectrometry[J]. Journal of Henan University of Science & Technology: Medical Science, 2012, 30(4): 275-276(in Chinese).
[7] 张红波,赵璐. 甲卡西酮的 GC/MS 定量分析方法[J]. 山西医科大学学报,2013,44(12):939-941.
ZHANG Hongbo, ZHAO Lu. Quantitative analysis of methcathinone by gas chromatography/mass spectrometry[J]. Journal of Shan-xi Medical University, 2013, 44(12): 939-941(in Chinese).
[8] 李文海,邵凯,蔺大伟,孙红雷. 快速溶剂萃取-气相色谱/质谱法分析血液中的甲卡西酮[J]. 分析测试技术与仪器,2016,22(3):189-192.
LI Wenhai, SHAO Kai, LIN Dawei, SUN Honglei. Analysis of methcathinone in blood by GC/

- MS with accelerated solvent extraction[J]. Analysis and Testing Technology and Instruments, 2016, 22(3): 189-192(in Chinese).
- [9] 代勇,周晓英,皮建华,吴永富,孙琴. SPME-GC-MS检测尿液中甲卡西酮类毒品[J]. 化学研究与应用,2015,27(9):1 394-1 397.
- DAI Yong, ZHOU Xiaoying, PI Jianhua, WU Yongfu, SUN Qin. Detection of methcathinones in urine samples by SPME-GC-MS[J]. Chemical Research and Application, 2015, 27(9): 1 394-1 397(in Chinese).
- [10] 刘冬娴,赵明明. GC-MS分析尿液中甲卡西酮[J]. 法医学杂志,2017,33(5):506-508.
- LIU Dongxian, ZHAO Mingming. Determination of methcathinone in urine by GC-MS[J]. Journal of Forensic Medicine, 2017, 33(5): 506-508(in Chinese).
- [11] 王平,刘晓云,刘遥,罗叶锋,王震. 人体尿液中卡西酮类毒品的 SPE-GC-MS定性定量分析[J]. 法医学杂志,2018,34(6):606-610.
- WANG Ping, LIU Xiaoyun, LIU Yao, LUO Yefeng, WANG Zhen. Qualitative and quantitative analysis of cathinones in human urine by SPE-GC-MS[J]. Journal of Forensic Medicine, 2018, 34(6): 606-610(in Chinese).
- [12] SØRENSEN L K. Determination of cathinones and related ephedrine in forensic whole-blood samples by liquid-chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(11/12): 727-736.
- [13] SWORTWOOD M J, BOLAND D M, DECAPRIO A P. Determination of 32 cathinone derivatives and other designer drugs in serum by comprehensive LC-QQQ-MS/MS analysis[J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405: 1 383-1 397.
- [14] ZHANG L, WANG Z H, LI H, LIU Y, ZHAO M, JIANG Y, ZHAO W S. Simultaneous determination of 12 illicit drugs in whole blood and urine by solid phase extraction and UPLC-MS/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 955/956: 10-19.