

ASE-GPC/GC/MS方法检验尿液中bk-MDMA

周欣¹ 郑天² 刘俊宁¹ 张绍雨² 刘景宁²

(1 江苏省南京市公安局物证鉴定所 江苏 南京 210001;

2 江苏警官学院公安科技系 江苏 南京 210012)

摘要: 采用快速溶剂萃取-凝胶渗透色谱-气相色谱质谱法检测尿液中新精神活性物质bk-MDMA。对目标物采用快速溶剂萃取技术进行萃取并采用凝胶渗透色谱技术净化, GC/MS检测分析。通过优化ASE萃取条件和GPC净化条件, 建立了尿液中bk-MDMA的ASE-GPC/GC/MS检测方法, 尿液中bk-MDMA浓度在0.1 μg/mL~5 μg/mL范围具有良好的线性关系, 最低检出限为0.01 μg/mL。日内相对标准(RSD)小于3.8%, 空白添加法测定方法的回收率为92%~94.7%。该方法自动化程度高, 灵敏度和回收率高, 重现性好, 可为法庭科学检验鉴定尿液中bk-MDMA提供技术支持。

关键词: 法医毒物分析 ASE GPC/GC/MS bk-MDMA

中图分类号: DF795.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-7939(2019)01-0103-04

DOI: 10.14060/j.issn.2095-7939.2019.01.016

1 引言

目前, 国内对于新精神活性物质的研究较少, 而且主要集中在针对新精神活性物质原药的分析与鉴定方面^[1-2], 而体内生物检材的提取方法和检测方法研究, 是当前毒品犯罪案件侦查中理化检验工作的重点内容。bk-MDMA是卡西酮类新精神活性药物, 1996年作为临床抗抑郁和抗帕金森药物使用, 但不久后发现其具有苯丙胺类毒品的精神活性^[3], 会造成人体一系列的如兴奋、焦虑、致幻等心理副作用, 使人产生致幻、暴力、自残等行为^[4]。

相较于传统的液液萃取法来说, 新的提取方法在毒品检验鉴定中发挥着越来越重要的作用, 例如微波萃取法^[5]、超临界萃取法、快速溶剂萃取法^[6]等。快速溶剂萃取是一种全自动化的萃取技术, 在植物油萃取、分子印迹聚合物、光敏剂、药物及其他诸多方向的研究中均有应用。ASE萃取技术因是

在高温高压状态下进行萃取, 其萃取效率比常温常压^[7]有大幅提升, 而且全自动化操作也可以避免人为误差, 有利于提高实验的重现性和精密度。考虑到生物检材中毒品原体的含量较低, 将ASE技术用于毒品特别是新精神活性物质的检验, 有助于提高提取率, 并可通过优化ASE方法中的各项参数选取最佳条件。凝胶渗透色谱是一种体积排阻的净化技术, 早期的GPC只能采用离线方式进行净化, 消耗时间较长, 目前已经实现了在线净化功能, 大幅提高了工作效率。GPC-GC/MS又是一种采用PTV大体积进样的设备, 其进样体积是普通GC/MS的5~10倍, 因此具有一定的待测化合物的富集效果。

本实验将ASE提取技术和高灵敏度的检测方法GPC-GC/MS结合对尿液中的bk-MDMA进行检测分析, 基本实现从前处理到净化, 以及检验过程的全自动处理过程。本实验所建立的ASE-GPC/GC/MS方法可供相关人员参考使用。

收稿日期: 2018-01-18

基金项目: 公安部科技基金项目(编号: 2016JSYJB05)。

作者简介: 周欣(1980-), 男, 江苏南京人, 江苏省南京市公安局物证鉴定所高级工程师, 主要从事毒物毒品分析研究。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

ASE350型快速溶剂萃取仪(赛默飞公司,美国),QP2010 GPC-GC/MS(岛津公司,日本),电子天平(梅特勒公司,瑞士),移液枪(吉尔森公司,法国),高速离心机(艾本德公司,德国)。

环己烷、乙酸乙酯(色谱纯, MERK, 德国), 硅藻土(赛默飞公司, 美国), 尿样采自健康志愿者(江苏省南京市公安局物证鉴定中心), bk-MDMA对照品由南京市公安局提供, 并用甲醇配制成1.0mg/mL的标准储备液。

2.2 仪器条件

2.2.1 加速溶剂萃取条件

萃取溶剂: 乙酸乙酯: 环己烷(V:V, 1:1); 加热时间: 5 min; 萃取温度: 110℃; 循环次数: 2次; 静态萃取时间: 5min; 冲洗体积: 60%; 氮气吹扫时间: 90s。

2.2.2 在线凝胶色谱条件

GPC色谱柱: Shodex CLNpak EV-200 (2.0 mm × 150 mm); 流动相: 环己烷: 丙酮(V:V, 7:3); 流速: 0.1mL/min; 柱箱温度: 40℃; 紫外检测器检测波长: 210 nm; 进样体积: 5 μL; 采集样品时间: 3.87 ~ 5.87min。

2.2.3 气相色谱条件

色谱柱: 惰性前置柱5m × 0.53mm; 预柱: DB-5MS (5m × 0.25mm × 0.25 μm); 分析柱: DB-5MS (30.0m × 0.25mm × 0.25 μm); 柱箱程序升温: 初始温度82℃ (5min) 10℃/min 280℃ (5.2min); PTV进样口: 初始温度: 初始温度120℃ (5min) 100℃/min 250℃ (23.7min); 压力程序: 120kpa 100kpa/min 180kpa (4.4min) -49.8kpa/min 120kpa (23.8min); 载气: 氦气, 进样方式: 不分流; 进样时间: 7min。

2.2.4 质谱条件

离子源: EI源, 70 eV; 离子源温度: 230℃; 接口温度: 280℃; 质量范围: 50 ~ 500m/z; 溶剂延迟时间: 9.5min; 扫描速度: 1000; 间隔: 0.50sec; Scan模式采集。

2.3 实验方法

将10mL不锈钢材质萃取池两端加上滤膜, 从底部装入硅藻土, 加入1.0mL尿样, 继续填装硅藻土后从顶部加滤膜密封。按照2.2.1条件置于ASE上

进行萃取。萃取液浓缩挥干, 100 μL定容供GPC-GC/MS分析。

3 结果与讨论

3.1 ASE萃取条件优化

3.1.1 萃取溶剂的选择

在选取萃取溶剂时除考量萃取溶剂与目标化合物的相似相容性以外, 还要兼顾ASE仪器本身的一些特点, 例如ASE350仪器本身不允许使用如乙醚这样燃点较低的溶剂, 或者如丙酮可能会影响萃取池密封性的溶剂。实验考察了乙酸乙酯: 环己烷(V:V, 1:1)、乙酸乙酯、二氯甲烷3种不同萃取溶剂的回收率, 平行萃取5次, 数据显示以乙酸乙酯: 环己烷(V:V, 1:1)的平均回收率96.6%, 高于乙酸乙酯92.6%和二氯甲烷96.1%, 如图1所示。乙酸乙酯: 环己烷(V:V, 1:1)与二氯甲烷的回收率相当, 但二氯甲烷的毒性较大, 综合考虑回收率、杂质干扰和环境危害等因素, 确定乙酸乙酯: 环己烷(V:V, 1:1)为本实验的萃取溶剂。

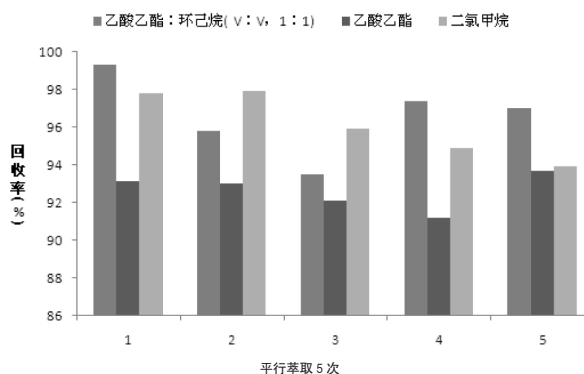


图1 ASE萃取溶剂和目标化合物回收率关系

3.1.2 萃取温度的选择

萃取温度是萃取过程中的一个关键因素, 因为温度越高越容易破坏溶剂与化合物之间的范德华力、氢键引力等, 减少了溶剂的粘性和表面张力, 从而能够让溶剂更好、更快、更有效地萃取目标化合物^[8]。一般来说, 萃取温度越高提取率越高, 但温度越高杂质也会相应增加。实验考察了萃取温度在80℃、90℃、100℃、110℃、120℃、130℃条件下的萃取效果, 如图2所示。结果证明, 随着温度的升高, 回收率增大, 但温度110℃以上时回收率增加已不明显, 且相应的杂质也增加, 兼顾两方面因素, 本实验选择萃取温度为110℃。

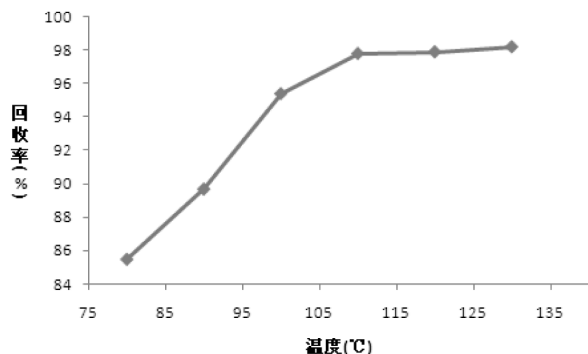


图2 ASE萃取温度与目标化合物回收率趋势

3.1.3 静态萃取时间和循环次数选择

随着静态萃取时间的增加,目标化合物在溶剂中的溶解度也逐步增加,但其效果随着时间的延长而逐步减弱。将一次较长时间的萃取过程分为两次,期间重新补充新的萃取溶剂,让目标化合物重新到达一次溶解与解析的动态平衡,将有助于萃取率的提高。而随着萃取次数的增加,目标化合物已经大部分被萃取出,这种增加循环次数的方式将无益于萃取率的进一步提高,反而会大幅度增加无效萃取时间,兼顾效率与效果的关系,将静态萃取次数选择为2次。实验考察了静态萃取时间在5min、10min、15min条件下的萃取效果,数据显示,随着萃取时间的增加回收率并未明显增加,如图3所示。为达到时间短、回收率高的目的,本实验选择5min的静态萃取时间。

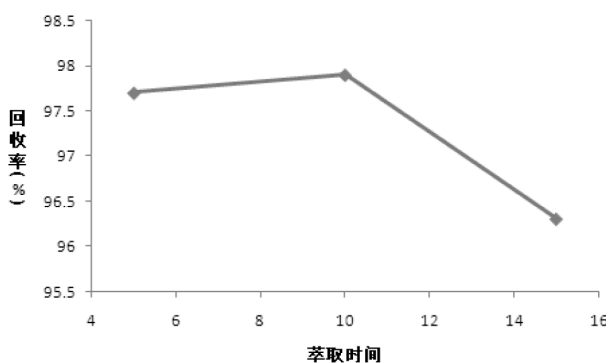


图3 ASE萃取时间与目标化合物回收率趋势

3.1.4 pH值的选择和氧化铝的添加

实验比较了不同pH值条件下的回收率,在pH值7回收率能达到较高水平,如图4所示,故选择中性条件下萃取。实验还比较了添加中性氧化铝前后的变化,发现回收率和色谱图并未达到其预期的净化效果。

3.2 GPC净化条件的选择

凝胶渗透色谱技术对小分子的目标化合物bk-

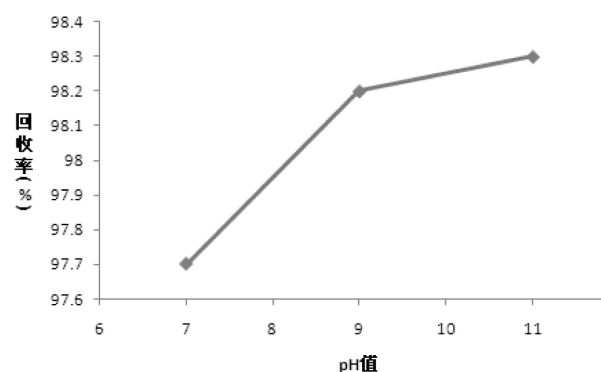


图4 pH值与目标化合物回收率趋势

MDMA和尿液中大分子量的杂质,通过体积排阻的原理可以加以区分。大分子量的杂质先流出,而小分子量的bk-MDMA后流出,通过分析两者不同的流出时间,可以选择截取合适的时间段进样,达到最大限度的凝胶净化的效果。实验通过在线凝胶色谱的紫外检测器对空白尿和bk-MDMA标准溶液进行测定,如图5所示。

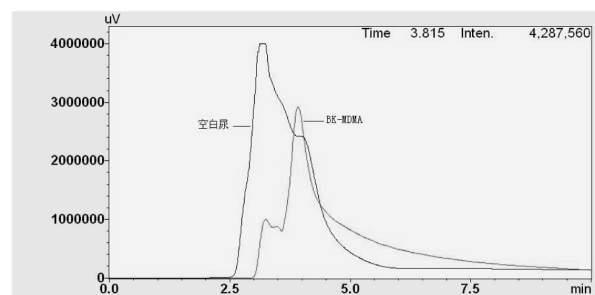


图5 空白尿和bk-MDMA的紫外光谱图

根据两者紫外吸收峰可以看出,空白尿中的杂质主要在2.55~3.90min流出,而目标化合物bk-MDMA主要在3.50~5.50min流出。为达到凝胶净化的最佳效果,本实验考察了3.32~5.32min和3.87~5.87min两个不同采集时间段的GPC净化回收率及杂质去除效果,如图6、7所示。

实验结果发现:在3.32~5.32min时间段内,bk-MDMA的特征离子m/z58对应的峰面积11906243;在3.87~5.87min时间段内,bk-MDMA的特征离子m/z58对应的峰面积23102309,并且通过总离子流色谱图也可以看出,在3.87~5.87min时间段内GPC的净化效果较好。因此,选择在3.87~5.87min时间段内收集组分,既能保证目标化合物有较高的回收率,同时又可最大程度地避免大分子尿素、蛋白质等杂质的干扰,达到GPC在线净化的目的。

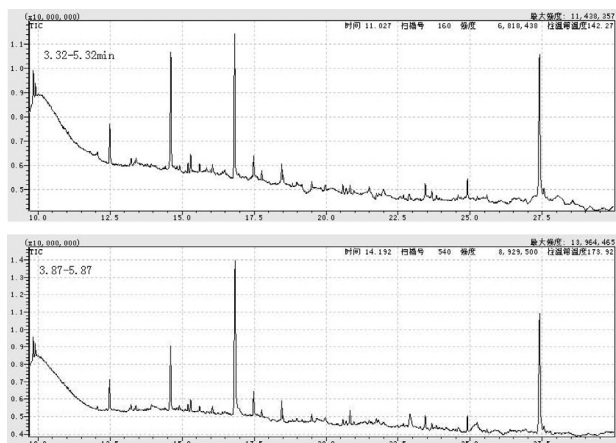


图6 空白尿标准添加 GPC 净化不同采集时间段的总离子流色谱图



图7 空白尿标准添加 GPC 净化不同采集时间段的选离子流 (m/z58) 色谱图

3.3 方法学验证

3.3.1 色谱条件的考察

在选定的仪器条件下, 目标物具有尖锐的色谱峰型, 空白尿在此无干扰。bk-MDMA的保留时间16.8min, 特征离子m/z为58、91、121、149、207。

3.3.2 方法的工作曲线和检出限

按照2.3的实验方法取空白尿液1mL, 分别加入一定量的bk-MDMA标液配制浓度为0.1、0.5、1.25、5 μg/mL的添加样品进行测定, 以bk-MDMA的浓度为横坐标, 以相应的峰面积为纵坐标绘制工作曲线, 线性回归方程为 $Y=264330X-19451$, 相关系数 $R^2=0.9997$ 。方法的检出限(S/N=3)为0.01 μg/mL。

3.3.3 方法的回收率和精密度

按照2.3的实验方法, 取空白尿液加入不同浓度的bk-MDMA标液进行测定, 每种浓度平行5份样品, 其回收率和相对标准偏差(RSD)如表所示。由表所示结果可知, 5种浓度的bk-MDMA的回收

率在92%~94.7%之间, 相对标准偏差(n=5)在2.1%~3.8%之间。

表 bk-MDMA 在尿液样品中的加标回收率 (n=5) 和精密度

加标量 (μg/g)	回收量 (μg/g)	回收率 (%)	RSD (%)
0.10	0.092	92.0	2.9
0.50	0.465	93.0	3.8
1.00	0.938	93.8	2.5
2.50	2.369	94.7	2.6
5.00	4.690	93.8	2.1

本实验采用ASE进行尿液的前处理过程实现了全自动操作, 有效避免了人工误差, 利用在线GPC-GC/MS进行分析, 回收率在92%~94.7%之间, 相对标准偏差在2.1%~3.8%之间, 方法的回收率和重现性等方法学指标均符合微量分析要求。实验结果表明, 采用ASE-GPC/GC/MS测定尿液中bk-MDMA的方法, 具有溶剂用量少、回收率高、杂质少等特点, 特别是方法的在线提取、净化和检测过程自动化程度高, 极大地提高了工作效率, 适用于司法案件尿液中bk-MDMA的检测分析。

参考文献:

- [1]郑水庆,吴忠平,汪蓉,等.3,4-亚甲二氧基甲卡西酮的鉴定[J].中国司法鉴定,2013(4):28-31.
- [2]黄星,王蔚昕,徐鹏,等.N-甲基-3,4亚甲二氧基卡西酮的确认[J].中国法医学杂志,2012(6):474-476.
- [3]Dal Cason T A,Young R,Glennon R A. Cathinone: an investigation of several N-alkyl and methylenedioxy-substitutedanalogs [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1997(4):1109-1116.
- [4]Mcintyre I M,Hamm C E,Aldridge L,et al.Acute methylene intoxication in an accidental drowning-A case report[J]. Forensic Science International,2013(1):1-3.
- [5]温锦锋,盛蔚,林贤文,等.微波样品前处理技术在毒物和毒品检验中的应用[J].中国刑警学院学报,2016(3):77-80.
- [6]周欣,王伟,刘景宁.ASE-GPC/GC/MS方法检验血中20种常见毒物[J].中国法医学杂志,2016(1):145-147.
- [7]Che J S, Yu R P, Song Q J, et al. Determination of synthetic musks in the sediment of the Taihu lake by using accelerated solvent extraction(ASE) and GC/MS [J]. International Journal of Environmental Analytical Cheml,2011(4):387-399.
- [8]牟世芬,刘克纳,阎炎,等.加速溶剂萃取及其在环境分析中的应用[J].环境化学,1997(4):387-391.

(责任编辑:孟凡骞)