

CLAM-2000 和 LC-MS/MS 联用测定尿样中的氯胺酮及其代谢物脱氢去甲氯胺酮含量

LCMSMS-405

摘要： 本文使用岛津全自动生物样本在线前处理设备 CLAM-2000 和 LC-MS/MS 在线联用系统，建立了人尿样中氯胺酮及其代谢物脱氢去甲氯胺酮的定量分析方法，整个实验流程不涉及手动前处理操作，从吸取样品、沉淀剂，到样品混匀、过滤，以及将处理完的样品输送到 LC-MS/MS 自动进样器均靠仪器自动完成，减少了人为误差，提高分析的准确度，适合尿样中苯丙胺类毒品的快速定量检测。本实验中基质标曲不同浓度点准确度在 88.7 ~ 112.6% 之间，不同浓度加标样品重复进样 6 次，保留时间 RSD 均小于 0.1%，峰面积 RSD 均小于 4.5%，质控样本实测浓度在允许波动范围内。

关键词： CLAM-2000 LC-MS/MS 尿样 氯胺酮及其代谢产物

近年来毒品的滥用呈明显增长的趋势，其中氯胺酮（俗称“K 粉”）属于最常见的毒品种类之一。它是苯环己哌啶的衍生物，属于分离性麻醉剂，吸食氯胺酮可能引发对吸食者肺部，心脏和大脑的永久损害，甚至导致死亡。氯胺酮的代谢产物包括去甲氯胺酮和脱氢去甲氯胺酮，大部分由肾脏排出。按照国际毒品检验标准，只要在生物检材中检出去甲氯胺酮或脱氢去甲氯胺酮即可作为吸食氯胺酮的证据。

蛋白质沉淀法是尿样等生物样品前处理时常用的一种手段，其几乎适用于任何极性的小分子化合物且

回收率较高。但是离线蛋白质沉淀法操作费时费力，操作人员频繁接触甲醇、乙腈、高氯酸等沉淀试剂和生物样品，具有潜在的生物危害风险。

岛津公司开发的 CLAM-2000 与 LC-MS/MS 联用系统，可利用 CLAM-2000 对全血、血浆、血清、尿液、唾液等生物样品自动进行蛋白质沉淀操作，然后将上清液自动传输至 LC-MS/MS 进行定量检测。

本文利用该系统建立了尿样中氯胺酮及其代谢物脱氢去甲氯胺酮含量的检测方法，以供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 CLAM-2000 和 LC-MS/MS 联用系统，具体配置为：CLAM-2000 生物样本自动前处理仪，LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A_{SR} 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。



图 1 CLAM-2000 与 LC-MS/MS 联用系

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GIST C18, 2.1 mm I.D. × 100 mm L. 2 μm

流动相: A 相 - 水 + 0.1% 甲酸 + 5mM 甲酸铵, B 相 - 甲醇 + 0.1% 甲酸 + 5mM 甲酸铵

流速: 0.40 mL/min,

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始比例为 25%, 梯度时间程序见表 1

表 1 梯度时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	Pumps	Pump B Conc.	25
0.80	Pumps	Pump B Conc.	60
1.00	Pumps	Pump B Conc.	95
1.30	Pumps	Pump B Conc.	95
1.40	Pumps	Pump B Conc.	25
3.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(+)

接口电压: 4 kV

接口温度: 300°C

加热块温度: 400°C

MRM 参数: 见表 2

雾化气流量: 3.0 L/min

加热气流量: 10.0 L/min

DL 温度: 250°C

干燥气流量: 10.0 L/min

表 2 MRM 参数

ID	化合物名称	监测离子对	Q1 pre (V)	CE (V)	Q3 Pre (V)
1	氯胺酮	238.10>125.10*	-17.0	-28.0	-20.0
		238.10>179.15	-12.0	-17.0	-16.0
2	脱氢去甲氯胺酮	222.10>142.15*	-16.0	-26.0	-23.0
		222.10>141.15	-12.0	-37.0	-22.0

注: 带 “*” 表示定量离子对

1.3 CLAM-2000 自动前处理

在 CLAM-2000 控制软件界面 KIT.Cond 菜单的子菜单 protocol 项下, 编辑样品自动前处理程序, 具体步骤为:

- (1) 在过滤管中加入 20 μL 甲醇活化过滤管, 准备上样;
- (2) 吸取尿样 30 μL 上样;
- (3) 加入 120 μL 甲醇沉淀蛋白;
- (4) 2100 rpm 震荡 60 秒;
- (5) 抽滤 120 秒;
- (6) 样品转移至自动进样器进样 2 μL, 流程如图 2 所示。

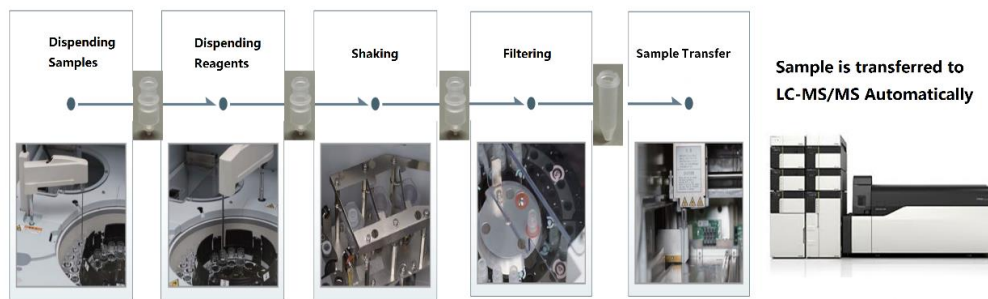


图 2 CLAM-2000 自动前处理流程

结果与讨论

本实验采用岛津生物样本全自动在线前处理系统 CLAM-2000 进行尿样的前处理，样品处理结束后会自动将样品输送到 LC-MS/MS 的自动进样器单元进行进样分析。本文中样品自动前处理程序包括吸取样品、吸取蛋白沉淀剂、振摇和过滤，总时间约 5 min，在 LC-MS/MS 进行分析的同时，自动前处理程序也在同时进行，并且 CLAM-2000 会根据前处理流程同时处理 2-3 个样品，即对样品的处理进行到振摇这一步骤时，系统会自动开始序列中下一个样品的处理。这种交叉处理样本的行为使得每个样品的 LC-MS/MS 分析时间间隔为 5 min，如图 3 所示。

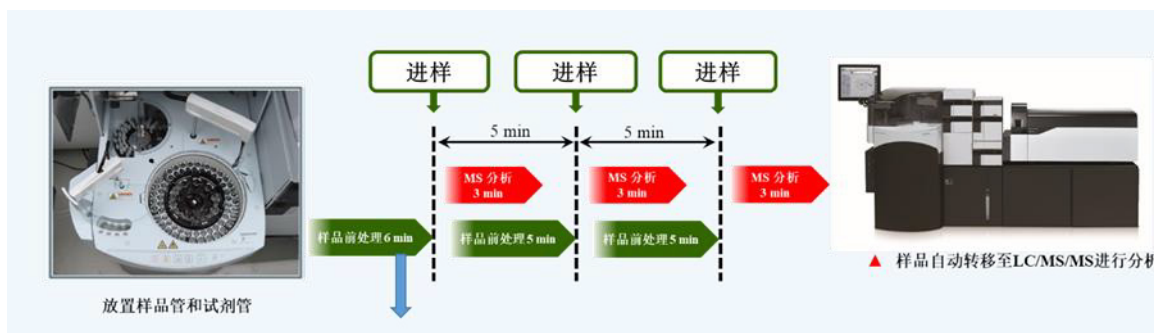


图 3 CLAM-2000 与 LC-MS/MS 联用工作模式

2.1 基质标准品色谱图

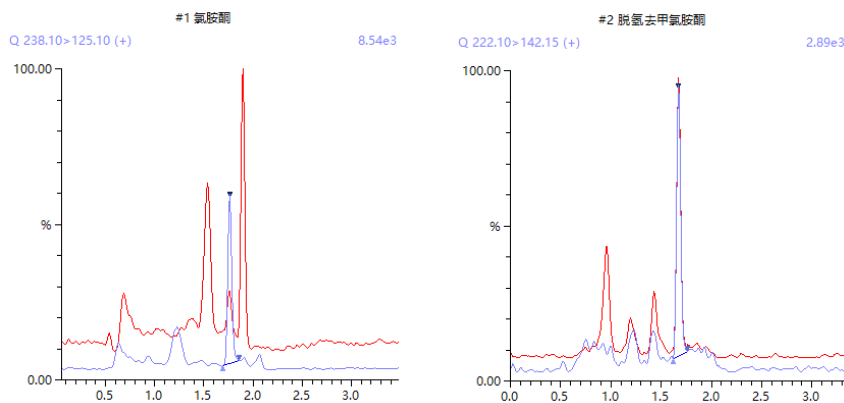


图 4 空白尿样加标 0.5 ng/mL 氯胺酮和脱氢去甲氯胺酮色谱图

2.2 校准曲线

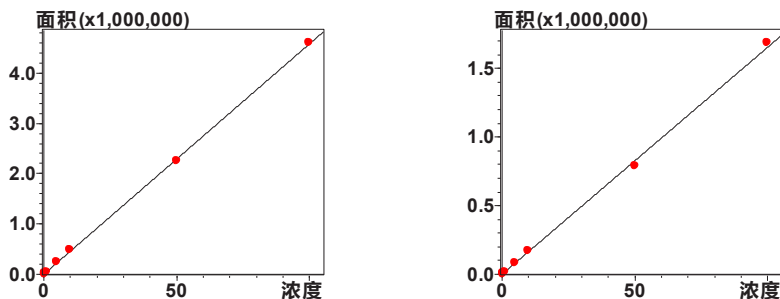


图 5 氯胺酮和脱氢去甲氯胺酮校准曲线 (0.2~100 ng/mL, 左: 氯胺酮; 右: 脱氢去甲氯胺酮)

在空白尿样中添加目标物标准溶液，依次配制成浓度分别为 0.2、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100 ng/mL 的加标溶液，按上述 1.3 处理流程处理样品后分析，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果如图 5 及表 3 所示。

表 3 校准曲线 (权重 1/C)

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	准确度 (%)	Q3 Pre (V)
氯胺酮	$Y = (45780.9)X + (878.8)$	0.2~100	0.9998	88.7~106.8	-20.0
脱氢去甲氯胺酮	$Y = (16540.1)X + (505.1)$	0.2~100	0.9995	90.0~112.6	-16.0

2.3 精密度实验

表 4. 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

名称	浓度 (ng/mL)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
氯胺酮	0.5	0.03	3.56
	5	0.04	1.56
	50	0.03	2.18
脱氢去甲氯胺酮	0.5	0.04	4.24
	5	0.05	3.34
	50	0.03	1.27

浓度为 0.5、5、50 ng/mL 的空白尿样加标样，按照 1.3 的处理流程，分别连续平行测定 6 次，考察该系统的精密度，结果如表 4 所示，表明 CLAM-2000 自动前处理液质联用系统对目标物的分析方法精密度良好。

2.4 质控样品测试结果

空白样品中分别加入 0.5、5 和 50 ng/mL 标准样品作为质控样 QCL, QCM 和 QCH，标示浓度和允许波动范围如表 5 所示，实际检测浓度在允许波动范围内。

表 5 质控样品检测结果

化合物	标示浓度 (ng/mL)			允许波动范围 (ng/mL)			实测浓度 (ng/mL)		
	QCL	QCM	QCH	QCL	QCM	QCH	QCL	QCM	QCH
氯胺酮	0.5	5	50	0.4-0.6	4-6	40-60	0.52	5.10	48.8
脱氢去甲氯胺酮	0.5	5	50	0.4-0.6	4-6	40-60	0.46	4.98	47.4

结论

本文使用岛津全自动在线前处理设备 CLAM-2000 和 LC-MS/MS 在线联用系统，建立了人尿样中氯胺酮及其代谢物脱氢去甲氯胺酮的定量分析方法，整个实验流程不涉及手动前处理操作，从吸取样品、沉淀剂，到样品混匀、过滤，以及将处理完的样品输送到 LC-MS/MS 自动进样器均靠仪器自动完成，减少了人为误差，提高分析的准确度，适合尿样中苯丙胺类毒品的快速定量检测。本实验中基质标曲不同浓度点准确度在 88.7~112.6% 之间，不同浓度加标样品重复进样 6 次，保留时间 RSD 均小于 0.1%，峰面积 RSD 均小于 4.5%，质控样本实测浓度在允许波动范围内。实验结果表明：该方法适合尿样中氯胺酮及其代谢物脱氢去甲氯胺酮的快速定量检测。