

药丸测试应用中的毒品靶向分析

Michael Gray, Adam Rohde

Waters Corporation

仅适用于法医毒理学应用。

摘要

我们开发出一种利用ACQUITY UPLC H-Class和CSH色谱柱技术的优势快速分析十种毒品的办法。所有十种碱性毒品（包括安非他命和3,4-亚甲二氧基甲基苯丙胺(MDMA)）均在3 min内得到色谱分离，总运行周期为6.3 min。该方法针对实验室和现场部署而开发。

与该方法相关的校准范围为0.005 mg/mL~0.1 mg/mL。制得的样品浓度为0.1 mg/mL。所有十种毒品化合物的校准曲线均表现出优异的线性，决定系数(R^2) ≥ 0.997 。在预期样品浓度(0.1 mg/mL)下，分析准确度出色，所有化合物的回收率百分比均在98%~103%的范围内。

利用Empower色谱数据系统(CDS)定量分析从音乐节上获取的毒品材料。利用谱库匹配功能改善化合物鉴定可信度，利用自动峰纯度计算功能进一步提高定量可信度。最后，采用ACQUITY QDa质谱检测器，对具有相似UV谱图的化合物展示质谱检测的显著优势。

优势

- 利用UPLC快速分离十种毒品化合物
- 碱性毒品化合物获得优异的峰对称性
- 简单的酸性流动相，兼容MS

- 使用Empower CDS和峰纯度实现准确定量
- 使用谱库匹配和质谱检测提高鉴定可信度

简介

毒品和药丸测试是一种减少危害的措施，目的是减小在音乐节及其他场合吸毒对健康产生的不利影响¹。几十年来，药丸测试已在全球一系列管辖区实施，力求更好地告知病人药物成分并提供可能改变用户行为的健康建议^{2,3}。在音乐节及其他场合进行药丸测试的呼声越来越高^{4,5}。但是，也有人担心，在节日环境中部署的药丸测试方法通常是定性方法，无法为服务病人提供毒品纯度等重要信息。

当前用于分析毒品的靶向LC-PDA分析方法通常依赖流动相添加剂，例如高pH条件下的吡咯烷，以在反相分离柱上获得合理的峰形。但是，将这类方法部署到现场存在严重的健康和安全问题。

本应用纪要介绍了一种使用ACQUITY UPLC H-Class搭配PDA和ACQUITY QDa质谱检测快速分离和定量十种毒品化合物的方法。利用表面带电杂化(CSH)色谱柱技术解决峰对称性和分离度不佳的难题，同时使用常见且简单的酸性流动相组成。由于流动相pH保持在较低水平，电喷雾效率大幅提升，从而能够有效利用ACQUITY QDa质谱检测器。质谱数据提供了额外的确证信息，能够进一步区分具有相似UV谱图的化合物，并且可靠地鉴定共洗脱物。还利用了Empower软件，自动使用峰纯度、UV谱库匹配和MS谱库匹配功能提高结果可信度。

实验

标样制备

标准品购自澳大利亚国家计量研究院（澳大利亚北莱德）或Tasmanian Alkaloids（澳大利亚韦斯特伯里）。用97%水/3%甲醇制备浓度为1 mg/mL的单标储备液。然后合并这些单标储备液，制得浓度范围为0.005 mg/mL~0.1 mg/mL的六种混标溶液。

样品前处理

从音乐节上获取的一系列固体毒品由澳大利亚国立大学经许可提供，用于组分鉴定和纯度检测。各毒品取1 mg溶

于97%水/3%甲醇中，制得最终浓度为0.1 mg/mL的样品。然后在分析前过滤(0.2 μm)样品溶液。

分析方法

表1~4详细列出了采用的分析条件，表5总结了用于鉴定十种分析物的具体条件。

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC H-Class PLUS
检测条件:	ACQUITY UPLC光电二极管阵列(PDA)检测器 ， 210~400 nm， 每秒20个数据点
样品瓶:	LCMS认证透明样品瓶（部件号：600000668CV）
色谱柱:	ACQUITY UPLC CSH C ₁₈ , 50 × 2.1 mm, 1.7 μm（ 部件号：186005296）
柱温:	40 °C
样品温度:	12 °C
进样体积:	1 μL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	甲醇

表1.液相色谱条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.500	97.0	3.0	-
0.3	0.500	97.0	3.0	6
3.00	0.500	58.5	41.5	6
3.10	0.500	30.0	70.0	6
3.60	0.500	30.0	70.0	6
3.70	0.500	97.0	3.0	6
6.20	0.500	97.0	3.0	6

表2.梯度表

质谱系统： ACQUITY QDa质谱检测器

电离模式： ESI+

采集范围： 50~600 Da

毛细管电压： 1

锥孔电压： 10 V

表3.ACQUITY QDa质谱检测器设置

色谱软件： Empower 3 CDS

质谱软件： Empower 3 CDS

信息学软件： Empower 3 CDS

表4.数据管理

化合物	RT (min)	UV λ (nm)	ACQUITY QDa离子(m/z)
吗啡	0.39	285	286.1
硫酸安非他命	1.07	257	91.1, 119.1, 136.1
盐酸甲基苯丙胺	1.35	257	91.0, 150.1
盐酸MDA	1.45	285	105.0, 134.8, 163.1, 180.1
盐酸MDMA	1.61	285	105.1, 135.1, 163.1, 194.1
盐酸PMA	1.68	275	91.0, 121.1, 149.0, 166.0
盐酸MDEA	1.92	285	ten5.0, 135.0, 163.0, 208.2
盐酸氯胺酮	2.29	257	125.0, 238.0
盐酸可卡因	2.55	275	304.1
海洛因	2.65	275	370.2

表5.用于组分分析的PDA和ACQUITY QDa检测器信息

结果与讨论

UPLC-PDA

十种毒品的分离结果如图1所示。为方便起见，在该色谱图中标记出所有组分。如图所示，所有十种组分均在3 min内完成基线分离和洗脱。

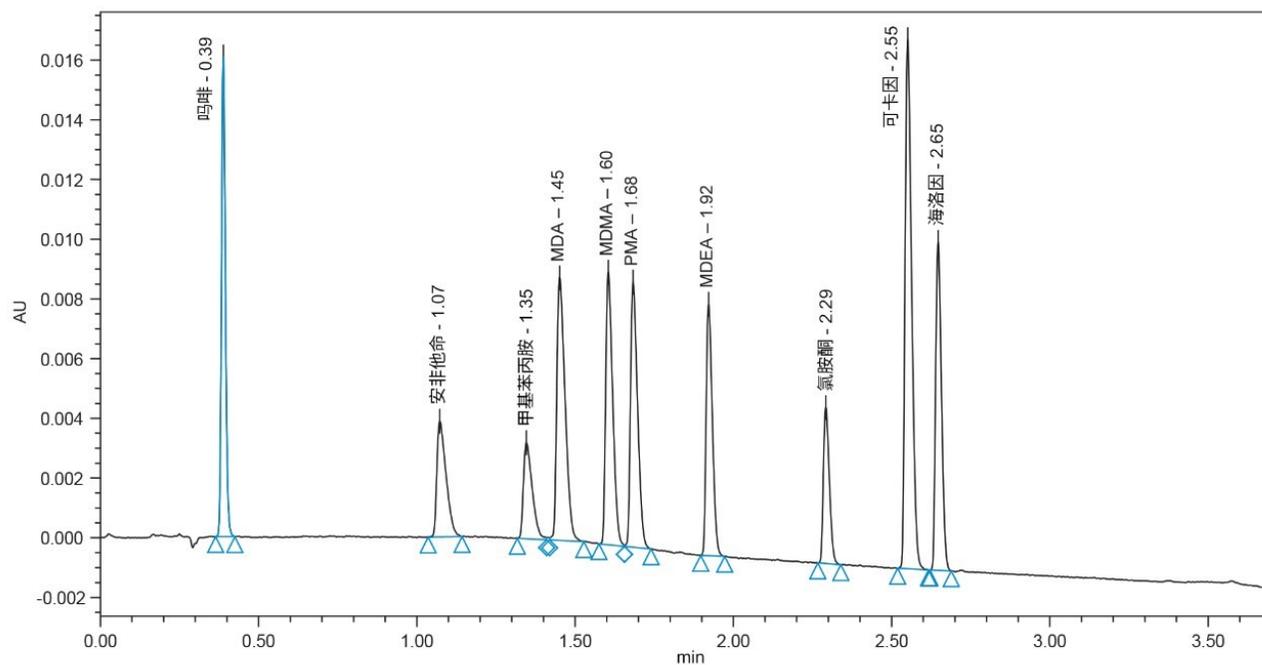


图1.十种毒品(0.05 mg/mL)的ACQUITY UPLC H-Class-PDA分离结果，使用CSH C₁₈色谱柱，检测波长257 nm。

本研究还评估了十种靶向毒品的校准曲线。应用了权重为1/x的线性拟合。结果见下面的表6，表现出优异的线性，所有化合物的决定系数均 ≥ 0.997 。校准曲线示例见图2。

QC %回收率/%RSD										
	化合物	R ²	0.005 mg/mL		0.015 mg/mL		0.050 mg/mL		0.100 mg/mL	
			R	P	R	P	R	P	R	P
1	吗啡	0.99996	99.7	0.9	101.1	0.7	97.6	0.9	99.3	1.3
2	硫酸安非他命	0.99992	102.4	3.1	103.1	0.4	100.4	1.2	101.3	0.9
3	盐酸甲基苯丙胺	0.99675	106.7	1.9	100.9	2.5	94.1	5.0	103.1	0.8
4	盐酸MDA	0.99999	100.2	0.7	100.8	1.2	98.0	0.9	99.1	1.1
5	盐酸MDMA	0.99997	101.1	1.1	101.9	0.9	99.0	0.9	100.1	1.2
6	盐酸PMA	0.99994	104.1	1.4	102.7	0.5	99.3	1.1	100.7	1.4
7	盐酸MDEA	0.99997	101.5	1.0	102.1	0.8	98.9	1.0	100.1	1.1
8	盐酸氯胺酮	0.99996	98.6	4.3	102.4	1.0	98.4	0.8	97.9	0.6
9	盐酸可卡因	0.99995	100.3	1.5	100.9	0.8	98.3	1.0	98.8	0.8
10	海洛因	0.99995	100.7	1.3	102.6	1.0	99.6	1.1	100.8	1.2

表6.0.005、0.015、0.05和0.1 mg/mL样品四次单独分析的校准曲线决定系数、平均QC样品回收率和RSD

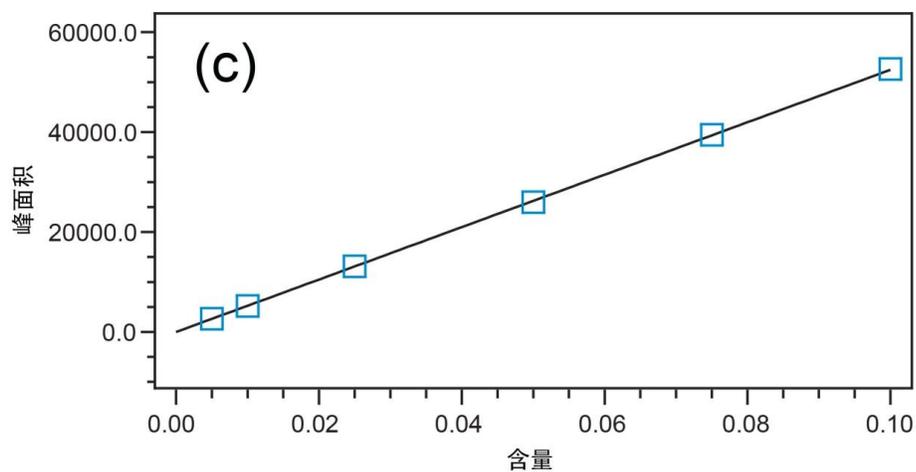
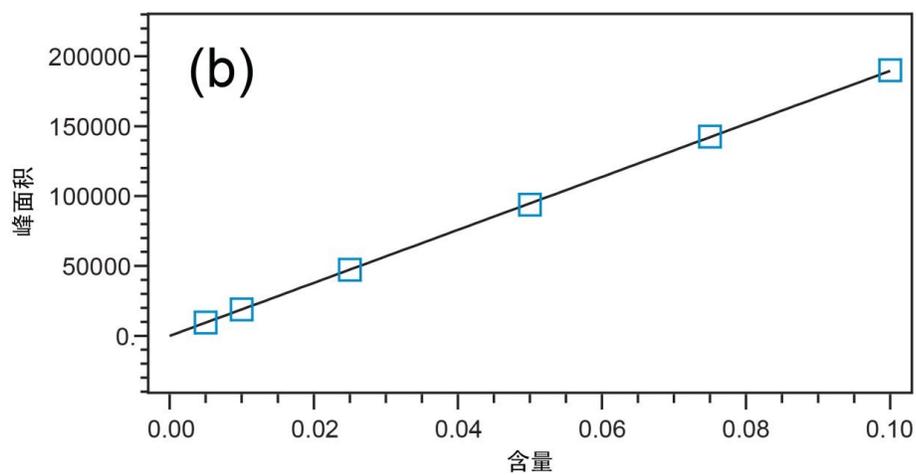
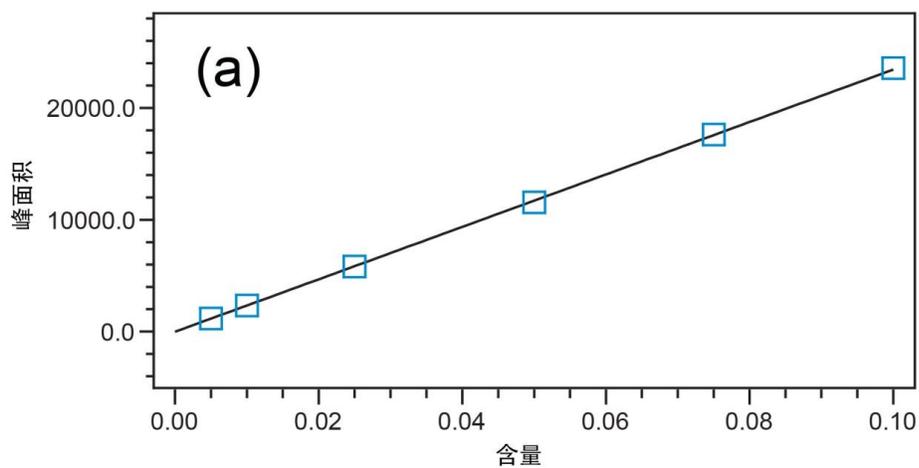


图2.(a)安非他命、(b) MDMA和(c)海洛因的标准曲线示例

制备四个QC标准品以评估定量分析中十种组分的回收率。但是，在各样品浓度为0.1 mg/mL的应用中，预计定量结果一般会接近上限。表6显示，0.1 mg/mL QC标准品四次单独分析的平均回收率在97.9%~103.1%的范围内，表现出良好的定量准确度。此外，这些测量的精密度优异，RSD百分比在0.6%~1.4%的范围内。更低浓度的样品也获得了可接受的准确度。

为评估所开发方法的性能，本研究考察了从音乐节上获取的11个样品。分析结果见下方表7。如上所述，称取1 mg未知样制得浓度为0.1 mg/mL的样品；0.1 mg/mL的检测结果相当于药物纯度为100%的盐酸盐；或相当于药物纯度为84%的相应游离碱。由于音乐节样品的盐形式未知，因此将MDMA的百分比含量以游离碱形式表示如下。在提交的样品中，MDMA被鉴定为七个样品的主要组分和一个样品的次要组分。其中包括样品7~10，它们代表同一来源或地点的四个单独样品，以及样品 11，这些样品均由接受紧急医疗服务的病人提供。另外3个样品由测试组之外的物质组成，利用FTIR检测方法，样品3和5被鉴定为*N*-乙基丁酮，样品6被鉴定为*N*-乙基戊酮。

样品	主要鉴定结果	%含量	其他检测
1	MDMA	77	无
2	MDMA	12	无
3	未知样	-	无
4	MDMA	53	两种组分未得到鉴定
5	未知样	-	无
6	未知样	-	无
7	MDMA	80	无
8	MDMA	79	无
9	MDMA	80	无
10	MDMA	81	无
11	MDMA	79	无

表7.音乐节样品的分析结果

通过UV谱图匹配提高组分鉴定可信度，对于与目标列表中的化合物具有类似保留时间的组分，该方法可大幅减少假阳性测定结果。图3显示了一个PDA匹配图示例，展示了样品谱图与PDA谱库谱图的比较。图3所示的PDA谱库匹配结果表列出了谱图对比评估的结果。在本例中，用PDA匹配角(0.065)表示的谱图差异明显小于PDA匹配阈值(1.088)，表明样品谱图与谱库谱图在统计学上相似。

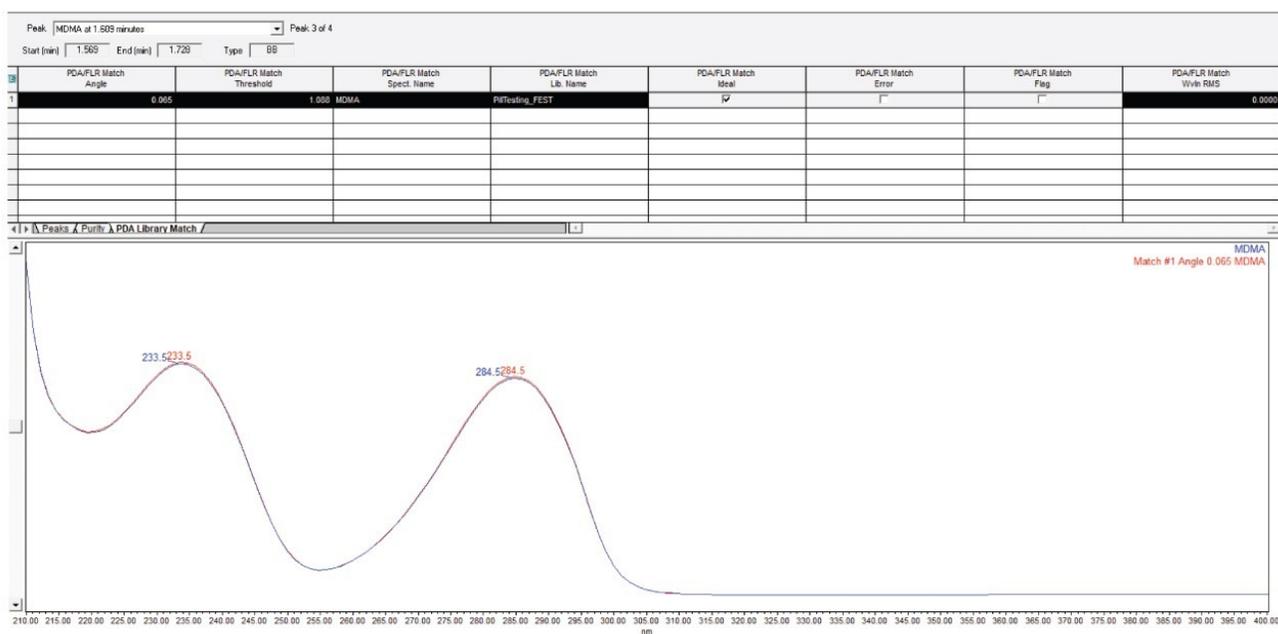


图3. Empower PDA 谱库匹配结果以及样品谱图与谱库谱图的 PDA 匹配图。蓝色迹线表示谱库谱图，红色迹线表示样品谱图。

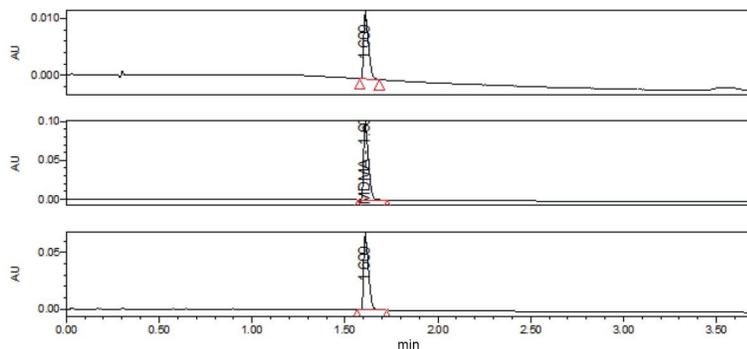
值得注意的是，一些组分的 UV 谱图几乎相同，因此在 UV 谱库匹配过程中需要筛选保留时间，例如安非他命和甲基苯丙胺。

本研究还采用了峰纯度来改善定量结果准确度的可信度。图 4 显示了样品峰的峰纯度评估示例，在整个峰宽范围内，纯度角始终低于纯度阈值。该结果表明，不存在可识别的共流出物。

UV摩尔吸光系数，并表现出无意义的定量结果。

样品信息			
样品名:	未知样	采集者:	Pilltesting
样品类型:	未知样	样品组名:	210226 Analysis CD
样品瓶:	1:B.6	采集方法组:	Pilltesting UV 6CD IM
进样编号:	1	处理方法:	Pilltesting 3D
进样体积:	1.00 ul	通道名:	257 nm, 275 nm, 285 nm
运行时间:	3.7 min	处理通道描述:	PDA Spectrum PDA 257.0 nm

自动缩放的色谱图

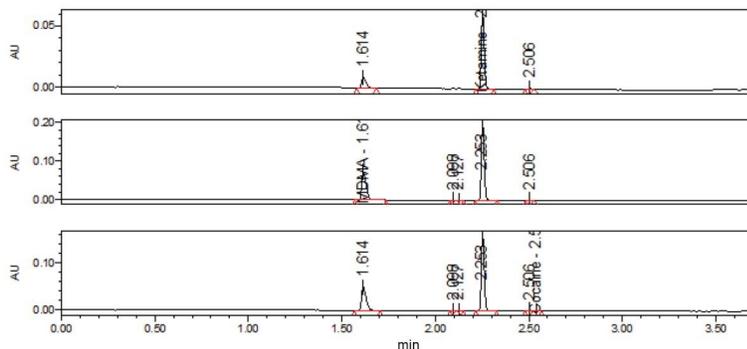


峰结果

名称	RT	含量	FREE_BASE_AMT	单位	谱库匹配 ID	匹配质量	峰纯度
1 MDMA	1.609	0.092	0.077	mg/mL	MDMA	匹配良好	纯品

样品信息			
样品名:	未知样	采集者:	Pilltesting
样品类型:	未知样	样品组名:	210226 Analysis CD
样品瓶:	1:C.1	采集方法组:	Pilltesting UV 6CD IM
进样编号:	1	处理方法:	Pilltesting 3D
进样体积:	1.00 ul	通道名:	257 nm, 275 nm, 285 nm
运行时间:	3.7 min	处理通道描述:	PDA Spectrum PDA 257.0 nm

自动缩放的色谱图



峰结果

名称	RT	含量	FREE_BASE_AMT	单位	谱库匹配 ID	匹配质量	峰纯度
1 MDMA	1.614	0.063	0.053	mg/mL	MDMA	匹配良好	纯品
2 氯胺酮	2.253	0.458		mg/mL			纯品
3 可卡因	2.540	0.001		mg/mL			纯品

图5.在音乐节期间对药丸中的未知样品进行测试的样品分析报告示例。(a)含有MDMA的样品；(b)含有MDMA和未

知掺杂物的样品。

此类信息在药丸测试环境中具有重要意义，它为提交毒品的人提供了基于风险的信息：除主要组分MDMA以外，样品中还包含大量未知毒品。

利用ACQUITY QDa提高鉴定可信度

在分析中纳入质谱检测可显著提高化合物鉴别力，尤其是当目标列表中包含的某些化合物具有非常相似的UV谱图时。图6举例比较了MDA、MDMA与MDEA的UV和ACQUITY QDa谱图。这些化合物的UV谱图几乎相同，但ACQUITY QDa质谱图显著不同，每种分子呈现出独特的质量数指纹图谱。质谱图的显著差异清楚提供了除保留时间和UV谱图以外的重要信息。质谱图的谱库匹配可按照与UV谱图相同的方式自动完成。

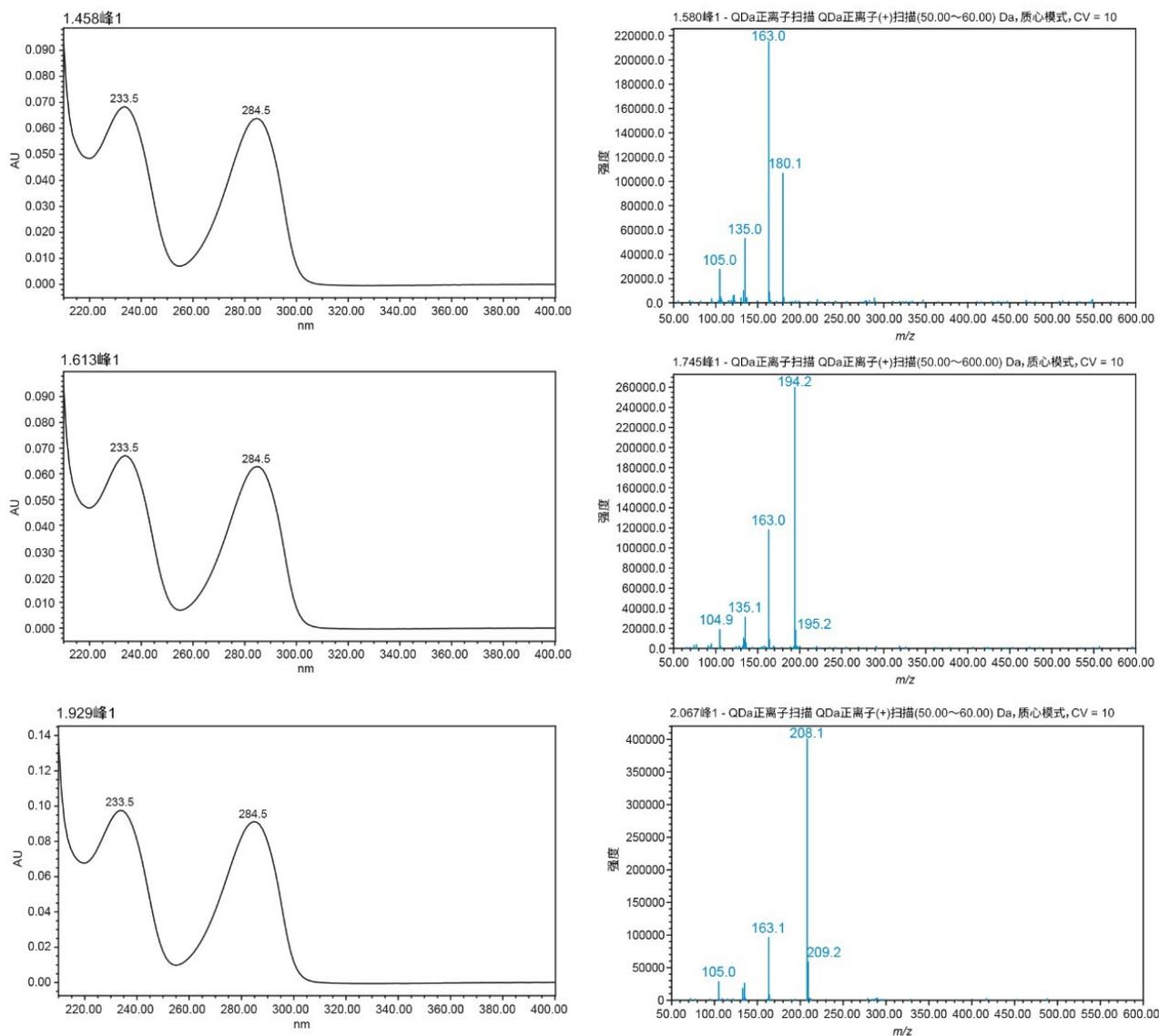


图6.(a) MDA、(b) MDMA和(c) MDEA的UV与ACQUITY QDa谱图比较

尽管并非本研究的重点，但可以肯定的是，ACQUITY QDa也可以用于定量分析，与UV检测相比可显著提高灵敏度和选择性。可能只需少量样品即可完成分析。

结论

- 本研究证明，ACQUITY UPLC H-Class搭配PDA和ACQUITY QDa为快速定量十种靶向毒品提供了理想的解决方案。
- UPLC运行周期为6.2 min，可实现快速分析。
- 标准曲线表现出优异的线性， R^2 值 ≥ 0.997 。
- PDA和ACQUITY QDa谱图提供了额外信息，有助于提高组分鉴定可信度。
- ACQUITY QDa使最终用户能够利用经济有效的质谱检测来区分UV谱图高度相似的组分。

参考资料

1. <https://www.health.act.gov.au/about-our-health-system/population-health/pill-testing> <
<https://www.health.act.gov.au/about-our-health-system/population-health/pill-testing>> .
2. Moller J., Jones, A. Pill-Testing as a Harm Reduction Strategy: Time to Have the Conversation. *Med.J Aust* 2019; 211: 10; <https://doi.org/10.5694/mja2.50385> <<https://doi.org/10.5694/mja2.50385>> .
3. Groves A. ‘Worth the Test?’ Pragmatism, Pill Testing and Drug Policy in Australia. *Harm Reduct J* 2018; 15: 12; <https://doi.org/10.1186/s12954-018-0216-z> <<https://doi.org/10.1186/s12954-018-0216-z>> .
4. <https://www.coronerscourt.vic.gov.au/coroner-calls-urgent-drug-testing-services-victoria> <
<https://www.coronerscourt.vic.gov.au/coroner-calls-urgent-drug-testing-services-victoria>> .
5. https://coroners.nsw.gov.au/coronerscourt/download.html/documents/findings/2019/Music_Festival_Redacted_f
<
https://coroners.nsw.gov.au/coronerscourt/download.html/documents/findings/2019/Music_Festival_Redacted_f
> .

致谢

由衷感谢澳大利亚国立大学的Malcolm McLeod副教授、Patrick Yates先生和Christopher Fitzgerald先生在本研究中提供的宝贵帮助。McLeod副教授是Pill Testing Australia的科学顾问。

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007435ZH, 2021年12月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.