

分析与监测

DOI: 10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2024.04.022

# 超高效液相色谱-串联质谱测定污水中依托咪酯

陈顺琴<sup>1</sup>, 高 煥<sup>1</sup>, 朱发泽<sup>1</sup>, 陈月猛<sup>2</sup>, 刘 杉<sup>2</sup>, 丁文波<sup>3</sup>,  
刘玉波<sup>1</sup>

(1. 贵州医科大学 医学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳市公安局 毒品检验中心,  
贵州 贵阳 550018; 3. 贵州万孚先义检测技术有限公司, 贵州 贵阳 550009)

**摘 要:** 基于超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术首次建立了污水中依托咪酯的分析检测方法,样品经在线固相萃取(On-line SPE)系统,以 HLB Direct Connect HP 固相萃取小柱(2.1 mm×30 mm, 20 μm)对目标化合物进行萃取后,采用乙腈-2 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,再将目标物反向加载至 Kinetex Biphenyl 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 2.6 μm),采用电喷雾正离子(ESI<sup>+</sup>)、多反应监测(MRM)模式分析检测。结果显示,依托咪酯在 1~300 ng/L 范围内线性关系良好,  $R^2$  为 0.999 7, 方法检出限(LOD)为 0.3 ng/L, 定量限(LOQ)为 1.0 ng/L。应用该方法对遵义地区 17 座污水处理厂进水口处依托咪酯的浓度进行检测,进一步验证了该方法的可靠性。污水样品中依托咪酯的检出率较低,其原因可能是依托咪酯经体内代谢后主要以依托咪酯酸的形式存在,检测结果与实际情况相符。依托咪酯于 2023 年 10 月 1 日起被纳入第二类精神药品列管目录,该方法的建立对依托咪酯的分析提供了技术参考。

**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS); 依托咪酯; 污水

**中图分类号:** TU992 **文献标识码:** B **文章编号:** 1000-4602(2024)04-0132-05

## Ultra-high Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Determination of Etomidate in Wastewater

CHEN Shun-qin<sup>1</sup>, GAO Huan<sup>1</sup>, ZHU Fa-ze<sup>1</sup>, CHEN Yue-meng<sup>2</sup>, LIU Shan<sup>2</sup>,  
DING Wen-bo<sup>3</sup>, LIU Yu-bo<sup>1</sup>

(1. School of Forensic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Drug Identification Center, Guiyang Municipal Public Security Bureau, Guiyang 550018, China;  
3. Guizhou Wanfu Xianyi Testing Technology Limited Company, Guiyang 550009, China)

**Abstract:** This paper established a method for analyzing and detecting etomidate in wastewater for the first time based on ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The target compounds in the wastewater samples were extracted by on-line solid phase extraction (on-line SPE) system with HLB Direct Connect HP solid phase extraction column (2.1 mm×30 mm, 20 μm). Then, acetonitrile, 2 mmol/L ammonium formate and 0.1% formic acid aqueous solution

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2020]4Y057号); 国家级大学生创新创业项目([2020]399号); 贵州省高技术产业化示范工程资助项目(黔发改高技[2016]1345号)

通信作者: 刘玉波 E-mail: 329572497@qq.com

were employed as mobile phase for gradient elution, and the target compounds were reverse loaded to Kinetex Biphenyl column (3.0 mm×100 mm; 2.6  $\mu\text{m}$ ) and eventually analyzed by using electrospray ionization (ESI<sup>+</sup>) and multiple reaction monitoring (MRM) mode analysis. Etomidate had a good linear relationship in the range of 1–300 ng/L. The  $R^2$  was 0.999 7, the limit of detection (LOD) was 0.3 ng/L, and the limit of quantitation (LOQ) was 1.0 ng/L. The method was applied to detect the concentration of etomidate in the inlet of 17 wastewater treatment plants in Zunyi, and the reliability of the method was further verified. The low detection rate of etomidate in wastewater samples might be due to the fact that etomidate existed mainly in the form of etomidate acid after metabolism in body, and the detection results were consistent with the actual situation. Etomidate has been included in the second category of psychotropic drugs since October 1, 2023, and the establishment of this method provides a technical reference for the detection of etomidate.

**Key words:** UPLC-MS/MS; etomidate; wastewater

污水流行病学(WBE)通过对生活污水采样后分析人类使用药品、化学品、外源性污染物和营养物质的含量,以掌握采样区域内某物质的使用情况<sup>[1-2]</sup>。通过污水分析可间接评价该地区的人群用药、健康、滥用药物情况等,对打击毒品犯罪、服务和保障民生安全具有重要意义。依托咪酯属于咪唑类衍生物,它是一种不溶于水的白色粉末状物质,为非巴比妥类静脉短效催眠药,由于其安全性高、起效快、维持时间短、药理活性高和循环稳定性强等优点,广泛应用于老年人以及心血管疾病等重症患者的麻醉诱导<sup>[3]</sup>。依托咪酯也属于新精神活性物质(NPS)<sup>[4-5]</sup>,并于2023年10月1日起被列入第二类精神药品目录。因在此之前未被列管,滥用现象较广泛,关于依托咪酯引发的社会公共安全事件不容忽视,其分析检测方法的开发刻不容缓。

目前关于依托咪酯检测仅有毛发、依托咪酯乳状注射液中的分析,但针对其在污水中的研究至今未见相关报道。因此,基于在线固相萃取技术,应用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法,建立了污水中依托咪酯的分析检测方法。该方法简便、快速、重复性良好,以期为公共安全行业准确、高效打击依托咪酯的滥用提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

仪器及材料:超高效液相色谱-串联质谱联用仪;高通量全自动固相萃取仪;涡旋混合器;0.1  $\mu\text{m}$ 和0.45  $\mu\text{m}$ 水相微孔滤膜。

试剂:依托咪酯标准储备液,浓度为100  $\mu\text{g/mL}$ ;

甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵等试剂;超纯水。

### 1.2 标准物溶液的制备

取100  $\mu\text{L}$ 依托咪酯标准储备液至10 mL容量瓶中,用甲醇稀释得到浓度为1.0  $\mu\text{g/mL}$ 的标准中间液。将标准中间液稀释后配制得到1、5、100 ng/mL的标准使用液,于0~4  $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存,试验时将标准使用液稀释至所需浓度使用。

### 1.3 仪器工作条件

#### 1.3.1 色谱条件

色谱柱:Kinetex Biphenyl (3.0 mm×100 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ),在线固相萃取柱:HLB Direct Connect HP (2.1 mm×30 mm, 20  $\mu\text{m}$ )。色谱柱温为35  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量500  $\mu\text{L}$ ,配有四元泵和二元泵,四元泵主要用于在线固相萃取(配置两根固相萃取柱),二元泵主要用于色谱分离(配置一根色谱柱)。四元泵流动相A为纯水,B为50%甲醇水溶液(体积分数,下同),C为1:1:1的甲醇、乙腈、异丙醇溶液,D为乙腈溶液,在线固相程序见表1。

表1 在线固相萃取条件

Tab.1 Conditions of on-line solid phase extraction

时间/min	流速/ ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%	流动相 D/%
0	2.0	100	0	0	0
3.8	0.01	100	0	0	0
4.1	2.0	100	0	0	0
5.0	2.0	0	0	100	0
6.0	2.0	20	0	0	80
9.0	2.0	20	0	0	80
9.1	2.0	0	100	0	0
10.0	2.0	100	0	0	0

二元泵流动相A为2 mmol/L 甲酸铵和0.1% 甲酸水溶液,B为乙腈,在线梯度洗脱程序见表2。

表2 在线固相萃取梯度洗脱条件

Tab.2 Gradient elution conditions of on-line solid phase extraction

时间/min	流速/(mL·min <sup>-1</sup> )	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.8	90	10
3.8	0.01	90	10
4.1	0.8	90	10
5.0	0.8	75	25
7.5	0.8	5	95
8.5	0.8	5	95
8.6	0.8	90	10
10.0	0.8	90	10

### 1.3.2 质谱条件

离子源和扫描模式:电喷雾电离正离子(ESI<sup>+</sup>);检测方式:多反应监测(MRM)模式;喷雾电压(IS):2 000 V;雾化气(GS<sub>1</sub>):379 211.7 Pa;离子源温度(TEM):550 ℃;气帘气(CUR):241 316.5 Pa;辅助气(GS<sub>2</sub>):413 685.4 Pa;驻留时间为20 ms;特征碎片离子对(母离子质荷比/子离子质荷比)分别为245.3/141.1、245.3/95.0,裂解电压(CE)分别为12、28 eV,碰撞能量(DP)为24 V,色谱保留时间 $t$ 为6.15 min。

### 1.4 试验方法

将待测污水样品充分摇匀,取5 mL于具塞离心试管中离心,取上清液2 mL经0.45 μm和0.1 μm水相微孔滤膜过滤,取500 μL经在线固相萃取仪萃取后,采用UPLC-MS/MS进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件的优化

依托咪酯采用UPLC-MS/MS的MRM模式进行检测。由于依托咪酯是一种刚被列管的新型滥用物质,因此其质谱参数未见标准或技术规范给出,在试验过程中需对其质谱参数(母离子、子离子、DP、CE)等进行探讨及优化。结果显示:依托咪酯的分子离子峰质荷比( $m/z$ )为245.3,定量离子和定性离子的 $m/z$ 分别为141.1和95.0,其中 $m/z=141.1$ 的离子由依托咪酯结构中的C—N键断裂生成, $m/z=95.0$ 的离子由 $m/z=141.1$ 的离子结构中的C—O进一步断裂生成,同时优化其DP及CE,优化结果见

1.3.2节。

### 2.2 色谱条件的优化

本研究考察了不同填料色谱柱对依托咪酯保留时间的影响,结果如图1所示。其中Kinetex Biphenyl(3.0 mm×100 mm,2.6 μm)简称“色谱柱1”,Allure PFP Propyl(100 mm×2.1 mm,5 μm)简称“色谱柱2”,ACQUITY UPLC HSS C18(150 mm×2.1 mm,3.5 μm)简称“色谱柱3”。

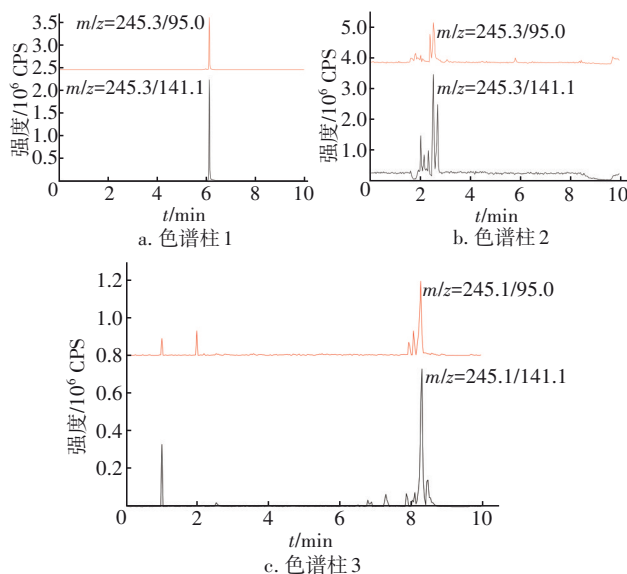


图1 不同色谱柱的依托咪酯MRM色谱

Fig.1 MRM chromatograms of etomidate on different chromatographic columns

由图1可知,采用色谱柱2时依托咪酯在色谱柱上不易被保留,约2 min时即被洗脱,对于基质较复杂的污水样品,色谱峰易被干扰,导致定性定量结果不准确;采用色谱柱3时依托咪酯在色谱柱中保留作用较强,约8.4 min被洗脱,附近有未知物质的色谱峰干扰,峰形不对称,分析时间较长;采用色谱柱1时,目标化合物在6.15 min左右出峰,峰形尖锐,半峰宽窄,附近不存在干扰,故试验选择色谱柱1对依托咪酯进行色谱分离分析。

### 2.3 样品前处理的优化

#### 2.3.1 提取方式的选择

试验采用手动固相萃取、离线固相萃取、在线固相萃取(On-line SPE)3种方式对目标化合物进行分析。结果显示:采用手动固相萃取和离线固相萃取时,所需污水体积较大,试验中固相萃取柱为一次性,对耗材需求量较多,前处理还需氮吹、浓缩,处理过程繁琐,耗时较长,易造成检材污染及假阳

性结果。当采用 On-line SPE 分析时,污水取样量为 2 mL,样品过滤后直接进样分析,样本利用率较高,固相萃取柱可重复使用,分析时长短,耗材成本低,有效提高了样品的检测效率,因此试验选择 On-line SPE 进行样品前处理。

### 2.3.2 固相萃取柱的选择

进一步考察了 HLB Direct Connect HP (2.1 mm×30 mm, 20 μm)、XBridge C18 Direct Connect HP (2.1 mm×30 mm, 10 μm)、XBridge C8 Direct Connect HP (2.1 mm×30 mm, 20 μm) 等固相萃取柱对依托咪酯的吸附及萃取效率。结果显示:当采用 XBridge C18 Direct Connect HP 和 XBridge C8 Direct Connect HP 固相萃取柱进行分析时,依托咪酯的保留效果较差,平均回收率( $n=6$ )分别为 54.3%、61.3%,不能满足分析要求;当采用 HLB Direct Connect HP 固相萃取柱时,目标化合物平均回收率( $n=6$ )为 79.8%,样品提取回收率较高,目标化合物保留时间附近的杂质峰干扰较少,分析结果准确可靠,因此试验选择 HLB Direct Connect HP 固相萃取柱对目标化合物进行分析。

### 2.4 线性关系、检出限、定量限

取若干份空白污水样品,分别添加不同体积的依托咪酯标准使用液,得到质量浓度分别为 1、2、5、10、20、50、100、200、300 ng/L 的线性工作液,余下步骤同 1.4 节,每个质量浓度重复检测 5 次,以添加依托咪酯的定量特征碎片离子平均峰面积( $y$ )为纵坐标,添加依托咪酯的质量浓度( $x$ )为横坐标进行线性回归。以 3 倍信噪比和 10 倍信噪比计算方法的检出限和定量限。可知,依托咪酯在 1~300 ng/L 范围内线性关系良好,线性方程为  $y=41\ 806x+5\ 239.6$ ,相关系数  $R^2$  为 0.999 7,检出限(LOD)为 0.3 ng/L,定量限(LOQ)为 1.0 ng/L,表明方法灵敏,能满足污水中依托咪酯的分析要求。

### 2.5 基质效应和提取回收率

基质效应(ME)表现为离子增强或抑制,试验时将其与提取回收率(RE)同时进行考察。于 6 份不同来源的空白污水样品中分别添加不同体积的标准使用液,配制含依托咪酯质量浓度分别为 2、20、200 ng/L 的阳性样品,前处理后采用 UPLC-MS/MS 分析,峰面积设定为  $S_{\text{样}}$ ;移取不同体积的标准使用液,配制含依托咪酯质量浓度分别为 2、20、200 ng/L 的无污水基质样品,进行 UPLC-MS/MS 分析,所

得峰面积设定为  $S_{\text{标}}$ ;取不同来源空白污水样品,经 0.45 μm 和 0.1 μm 水相微孔滤膜过滤后分别添加不同体积的标准使用液,使处理后的污水样品中依托咪酯质量浓度分别为 2、20、200 ng/L,所得峰面积设定为  $S$ ;以上所有样品均平行测定 6 次,取平均值。ME 和 RE 的计算方法如下:

$$ME = \frac{S - S_{\text{标}}}{S_{\text{标}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$RE = \frac{S_{\text{样}}}{S} \times 100\% \quad (2)$$

结果显示:依托咪酯质量浓度为 2、20、200 ng/L 污水样品的 RE 分别为 103.2%、87.0%、118.9%,相对标准偏差(RSD)分别为 11.1%、15.1%、8.4%;ME 分别为 -15.9%、-9.6%、-11.4%。由于污水基质相对较为复杂,因此依托咪酯的 ME 存在一定的抑制现象,但满足方法学规定<sup>[6-7]</sup>,因此该方法能满足污水中依托咪酯的分析要求。

### 2.6 精密度和准确度

于 15 份来源相同的空白污水样品中分别添加不同体积的标准使用液,制备含依托咪酯质量浓度分别为 2、20、200 ng/L 的污水样品进行试验,每个浓度梯度平行测定 5 次。相同浓度 1 d 内分析得到日内精密度(Intra-RSD),不同浓度、不同时间点的测定值为日间精密度(Inter-RSD)。准确度采用偏倚(Bias)表示,以添加的质量浓度为参考值( $S_{\text{参考值}}$ ),连续分析 6 d 的均值作为测定值( $S_{\text{测定平均值}}$ ),Bias 的计算方法如下:

$$\text{Bias} = \frac{S_{\text{测定平均值}} - S_{\text{参考值}}}{S_{\text{参考值}}} \times 100\% \quad (3)$$

结果显示:依托咪酯质量浓度为 2、20、200 ng/L 污水样品的 Bias 分别为 -6.0%、0.4%、8.9%;对应的 Intra-RSD 分别为 12.9%、17.4%、11.9%;Inter-RSD 分别为 13.1%、14.6%、11.6%。方法精密度和准确度良好,可以满足污水中微量依托咪酯的分析要求。

### 2.7 实际案例应用

采用 UPLC-MS/MS 分析遵义市各地区 2022 年第四季度采集的 17 座污水处理厂(A~Q)进水口的 170 份污水样品。结果显示:在 A、G、N 这 3 座污水处理厂检出目标化合物依托咪酯的质量浓度分别为 29.3、18.9、1.7 ng/L,其中 P 污水厂也检出了依托咪酯,但由于其浓度低于 LOQ,因此未定量。通



过实际案例中17个污水处理厂的检测结果可知,依托咪酯在污水中的检出率较低,分析其原因可能为依托咪酯经体内代谢后大部分以依托咪酯酸的形式由尿液排出体外,依托咪酯在尿液中的浓度较低导致其在污水中的检出率较低。同时,若某地污水中检出依托咪酯,其来源主要有以下几种可能:①该地区使用依托咪酯的量较大,其原药在体内未完全吸收就经尿液排出体外;②当地存在依托咪酯非法使用者或非法生产加工人群,在紧急情况下将依托咪酯直接倾倒入下水管道,导致依托咪酯在该批次的污水中被检出;③当地可能存在依托咪酯的生产加工企业,将生产加工过程中产生的废弃依托咪酯原体未经过严格处理就直接排入下水管道,以致区域内污水处理厂该批次污水中检出依托咪酯成分。

### 3 结论

基于UPLC-MS/MS技术建立了污水中依托咪酯的分析方法。该方法简便、快速、样品用量少,经水相滤膜过滤后直接分析,无需浓缩,大大提高了检测效率。方法回收率稳定, $RSD \leq 15.1\%$ , $LOD = 0.3 \text{ ng/L}$ ,准确度高、线性关系良好。通过案例分析得到依托咪酯在污水中的检出率较低,分析其原因为依托咪酯经人体代谢后主要以依托咪酯酸的形式进入污水。因此,若欲准确分析城市污水中依托咪酯的滥用情况,需尽快开发污水中依托咪酯酸的分析检测方法。

### 参考文献:

- [1] LI J, GAO J, THAI P K, *et al.* Transformation of illicit drugs and pharmaceuticals in sewer sediments [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(20): 13056–13065.
- [2] 向平. 污水毒品监测技术: 进展、挑战与展望[J]. 中国司法鉴定, 2022(5): 17–21.
- XIANG Ping. Monitoring technology of drugs in sewage: progress, challenges and prospects [J]. *Chinese Journal of Forensic Sciences*, 2022(5): 17–21 (in Chinese).
- [3] 湛雅雨, 张兴安, 丁立姝, 等. 依托咪酯靶控输注时靶浓度与实测血药浓度的差值分析和系统性能评价[J]. 临床麻醉学杂志, 2019, 35(11): 1065–1069.
- CHEN Yuyu, ZHANG Xing'an, DING Lishu, *et al.* Analysis of the difference between target and measured plasma concentrations of etomidate administered by TCI and evaluation of the performance of the TCI system [J]. *Journal of Clinical Anesthesiology*, 2019, 35(11): 1065–1069 (in Chinese).
- [4] 廖林川, 王玉瑾, 刘俊亭, 等. 法医毒物分析[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 5.
- LIAO Linchuan, WANG Yujin, LIU Juntong, *et al.* *Forensic Toxicological Analysis* [M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2017: 5 (in Chinese).
- [5] 原帅, 骆如欣, 向平. 城市生活污水中新精神活性物质的监测研究进展[J]. 法医学杂志, 2021, 37(4): 470–478.
- YUAN Shuai, LUO Ruxin, XIANG Ping. Research advances in the monitoring of new psychoactive substances in municipal wastewater [J]. *Journal of Forensic Medicine*, 2021, 37(4): 470–478 (in Chinese).
- [6] 侯臣之, 花镇东, 徐鹏, 等. 基于污水分析法的毒情评估研究及应用进展[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(4): 502–508.
- HOU Chenzhi, HUA Zhendong, XU Peng, *et al.* Research and application progress on evaluation of the abuse of illicit drugs based on wastewater analysis [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2018, 49(4): 502–508 (in Chinese).
- [7] 司法部. 法医毒物分析方法验证通则: SF/T 0063—2020[S]. 上海: 司法鉴定科学研究院, 2020.
- Ministry of Justice. General Rules for Method Validation in Forensic Toxicology: SF/T 0063—2020 [S]. Shanghai: Academy of Forensic Science, 2020 (in Chinese).

作者简介: 陈顺琴(1989—), 女, 贵州遵义人, 硕士, 讲师, 法医毒物司法鉴定人, 主要从事法医毒药物的方法学研究及毒代动力学研究。

E-mail: 981648215@qq.com

收稿日期: 2023-09-15

修回日期: 2023-10-25

(编辑: 沈靖怡)