



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4401.1—2015

临床检验标本中毒品成分的 定性及定量分析方法 第 1 部分：氯胺酮

Methods of qualitative and quantitative analysis for drug in clinical sample—
Part 1: Ketamine

2015-12-04 发布

2016-07-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

SN/T 4401《临床检验标本中毒品成分的定性及定量分析方法》分为 4 部分：

- 第 1 部分：氯胺酮；
- 第 2 部分：甲基苯丙胺类毒品；
- 第 3 部分：吗啡类毒品；
- 第 4 部分：大麻类毒品。

本部分为 SN/T 4401 的第 1 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：高博、曹洁、张建明、蔡怡珊、黄恩炯、肖武。

临床检验标本中毒品成分的 定性及定量分析方法 第1部分:氯胺酮

1 范围

SN/T 4401 的本部分规定了人体尿液和血清中氯胺酮的三种测定方法,即气相色谱-质谱/质谱法(GC-MS/MS)、液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS)和气相色谱法[包括配氢火焰离子化检测器(GC-FID),配氮磷检测器(GC-NPD)]。

本部分适用于人体尿液和血清中氯胺酮的定量测定;气相色谱-质谱/质谱法、液相色谱-质谱/质谱法同时适用于人体尿液和血清中氯胺酮的定性确证。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 气相色谱-质谱/质谱法(GC-MS/MS)

3.1 原理

试样在碱性条件下,用乙酸乙酯提取生物检材中的氯胺酮,采用多反应监测质谱扫描模式(MRM),用化合物的保留时间和质谱特征碎片离子丰度比定性,外标法定量。

3.2 试剂与材料

3.2.1 实验用水为 GB/T 6682 规定的二级水。

3.2.2 氢氧化钠:分析纯。

3.2.3 甲醇:色谱纯。

3.2.4 乙酸乙酯:分析纯。

3.2.5 氯胺酮标准品: CAS 6740-88-1, 纯度 $\geq 99.0\%$ 。

3.2.6 氯胺酮标准储备液: 准确称取 10 mg(精确到 0.1 mg)盐酸氯胺酮标准品于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成浓度为 1 mg/mL 标准样品储备液。于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下冰箱中避光保存一年。试验中根据需要稀释使用。

3.2.7 氦气: 纯度 $\geq 99.999\%$ 。

3.2.8 氮气: 纯度 $\geq 99.999\%$ 。

3.3 仪器及器材

3.3.1 气相色谱-质谱/质谱(GC-MS/MS)仪: 配有电子轰击电离离子源(EI)。

3.3.2 氮气吹干仪。

3.3.3 离心机:转速不低于 4 000 r/min。

3.3.4 分析天平:感量 0.1 mg。

3.3.5 超声波水浴。

3.3.6 涡旋混合器。

3.3.7 实验室常用玻璃器材。

3.4 样品前处理

取尿液或血清 1 mL 置于 10 mL 具塞离心管中,用 4 mol/L 氢氧化钠调 pH 13,用 2 mL 乙酸乙酯分别萃取两次,以 10 000 r/min 离心 3 min,有机层合并转移至另一试管中,于 40 °C 下氮气吹干,残留物用 200 μ L 甲醇溶解,取 1 μ L 进 GC-MS/MS 分析。

3.5 气相色谱-质谱/质谱测定

3.5.1 仪器参考条件

包括:

- a) 色谱柱:5%苯基甲基聚硅氧烷石英毛细管柱,30 m \times 0.25 mm(内径) \times 0.25 μ m,或相当者。
- b) 流速:1.0 mL/min。
- c) 程序柱温:120 °C 保持 1 min,以 20 °C/min 的速率升温至 250 °C,保持 1 min。
- d) 进样口温度:250 °C。
- e) 接口温度:280 °C。
- f) 进样方式:分流。分流比:10:1。
- g) 进样量:1 μ L。
- h) 电离方式:电子轰击电离(EI)。
- i) 电离能量:70 eV。
- j) 离子源温度:230 °C。
- k) 四极杆温度:150 °C。
- l) 碰撞气:氮气。
- m) 扫描方式:多反应监测(MRM),定量离子 m/z 180 $>$ 116.1(最优碰撞能量 25 V),定性离子 m/z :180 $>$ 151(最优碰撞能量 10 V), m/z :180 $>$ 145.1(最优碰撞能量 10 V)。

3.5.2 标准曲线的绘制

取空白样品按照 3.4 处理。用所得的样品溶液将氯胺酮标准储备液(3.2.6)逐级稀释得到的浓度为 0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、25 μ g/mL 的标准工作液,浓度由低到高进样检测。以标准工作溶液浓度为横坐标,定量离子质量色谱峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。标准溶液的 GC-MS/MS 多反应监测质量色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

3.5.3 定量测定

待测样液中氯胺酮的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样分析。

3.5.4 定性判定

按照上述条件测定试样和标准工作溶液,如果试样中的质量色谱峰保留时间与标准工作溶液一致(变化范围在 $\pm 2.5\%$ 之内),样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度与浓度相当标准溶液的相对丰度一致,相对丰度偏差超过表 1 的规定,则可判断样品中存在氯胺酮。

表 1 定性离子相对丰度的最大允许偏差

相对离子丰度比	>50%	>20%至 50%	>10%至 20%	≤10%
允许的相对误差	±20%	±25%	±30%	±50%

3.5.5 结果计算

以外标-校准曲线法或按式(1)计算被测样品中氯胺酮浓度。

$$C = \frac{A_1 V_2}{A_2 V_1} \times C_s \dots\dots\dots (1)$$

式中：
C —— 检材中氯胺酮的浓度，单位为微克每毫升或者微克每克(μg/mL 或 μg/g)；
A₁ —— 进样甲醇溶液中氯胺酮的峰面积；
V₂ —— 进样甲醇溶液体积；
C_s —— 加标样品中氯胺酮的浓度，单位为微克每毫升或者微克每克(μg/mL 或 μg/g)；
A₂ —— 加标样品中氯胺酮的峰面积；
V₁ —— 检材的体积。

3.6 空白试验

除不称取样品外，均按上述测定条件和步骤进行。

3.7 方法定量限

本方法的定量限为 2 ng/mL。

3.8 回收率

选择氯胺酮浓度低中高三个浓度水平分别为：0.5 μg/mL、2 μg/mL 和 20 μg/mL，每个浓度水平采用五个平行样品进行标准氯胺酮样品添加回收以及精密度试验，结果表明其回收率均在 80%~120% 之间，相对标准偏差均<10%。

3.9 允许差

样品应按以上步骤同时平行测定两份，在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 15%时，定量数据可靠，按两份检材平均值出定量结论。相对相差>15%，定量数据不可靠，需重新进行测定。

4 液相色谱-质谱/质谱法(LC/MS/MS)

4.1 原理

试样在碱性条件下用乙酸乙酯提取生物检材中的氯胺酮，用液相色谱-质谱/质谱法测定和确证，外标法定量。

4.2 试剂

4.2.1 试验用水为 GB/T 6682 规定的二级水。

SN/T 4401.1—2015

- 4.2.2 乙腈:色谱纯。
- 4.2.3 甲酸:色谱纯。
- 4.2.4 乙酸胺:色谱纯。
- 4.2.5 其他同 3.2。

4.3 仪器及器材

- 4.3.1 液相色谱-质谱/质谱(LC-MS/MS)仪:配有电喷雾离子源(ESI)。
- 4.3.2 其他同 3.3。

4.4 样品处理

取尿液或血清 1 mL 置于 10 mL 具塞离心管中,用 4 mol/L 氢氧化钠调 pH 13,用 2 mL 乙酸乙酯分别萃取两次,以 10 000 r/min 离心 3 min,有机层合并转移至另一试管中,于 40 ℃下氮气吹干,残留物用 200 μL 甲醇-水(1 : 1)进行溶解,溶液再稀释 100 倍,过 0.45 μm 有机系滤膜,取 5 μL 进 LC-MS/MS 分析。

4.5 液相色谱-质谱/质谱测定

4.5.1 LC 参考条件

- 包括:
- a) 色谱柱:C18 填料柱,150 mm×4.6 mm(内径)×5 μm,或相当者。
 - b) 流动相:流动相 A 为纯净水加 2‰甲酸和 5 mmol/L 乙酸胺,流动相 B 为乙腈,洗针液为 1 : 1 的甲醇水。液相梯度洗脱如表 2。

表 2 液相梯度洗脱方法

时间 min	B 相乙腈比例 %
0.50	10
2	20
3	90
4	90
5~8	10

- c) 进样量:5 μL。
- d) 柱温:40 ℃。
- e) 流速:1 mL/min。

4.5.2 MS/MS 参考条件

- 包括:
- a) 电离方式:电喷雾电离,正离子。
 - b) 离子喷雾电压:5.5 kV。
 - c) 雾化气:氮气,60 psi。
- 注: 1 psi=6. 895 kPa。

- d) 干燥气:氮气,60 psi,温度 650 ℃。
- e) 碰撞气:氮气。
- f) 分辨率:Q1(单位)Q3(单位)。
- g) 扫描模式:多反应监测(MRM),母离子 m/z 238.2,定量离子 m/z 125.1,定性离子 m/z 179.2, m/z 220.1。
- h) 碰撞能量: m/z 238.2 $>$ 125.1 为 40 eV, m/z 238.2 $>$ 179.2 为 22 eV, m/z 238.2 $>$ 220.1 为 18 eV。
- i) 其他参数:去簇电压(DP)为 26 V,入口电压为(EP)10 V,碰撞池出口电压(CXP)为 3 V,色谱峰保留时间为 3.89 min。

4.5.3 标准曲线的绘制

取空白样品按照 4.4 处理。用所得的样品溶液将氯胺酮标准溶液(3.2.6)逐级稀释得到的浓度为 5 ng/mL、12.5 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的标准工作液,浓度由低到高进样检测,以定量离子面积-浓度作图,得到标准曲线回归方程。基质加标氯胺酮样品 LC-MS/MS 多反应监测质量色谱图参见图 A.2。

4.5.4 定量测定

待测样液中氯胺酮的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样分析。

4.5.5 定性判定

以标准品的保留时间以及多反应监测离子(m/z 238.2 $>$ 125.1、 m/z 238.2 $>$ 179.2、 m/z 238.2 $>$ 220.1)定性,其他定性判定原则同 3.5.4。

4.5.6 结果计算

同 3.5.5。

4.6 空白试验

除不称取样品外,均按上述测定条件和步骤进行。

4.7 方法定量限

本方法的定量限为 0.3 ng/mL。

4.8 回收率

选择氯胺酮浓度低中高三个浓度水平分别为:5 ng/mL、50 ng/mL 和 200 ng/mL,每个浓度水平采用五个平行样品进行标准氯胺酮样品添加回收以及精密度试验,结果表明其回收率均在 80%~120%之间,相对标准偏差 $<$ 10%。

4.9 允许差

样品应按以上步骤同时平行测定两份,在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 15%时,定量数据可靠,按两份检材平均值出定量结论。相对相差 $>$ 15%,定量数据不可靠,需重新进行测定。

SN/T 4401.1—2015

5 气相色谱法(GC-FID 和 GC-NPD)

5.1 原理

试样中的氯胺酮经乙酸乙酯萃取处理后,用气相色谱配有氢火焰离子化检测器(FID)或气相色谱配有氮磷检测器(NPD)进行检测,与平行操作的氯胺酮标准样品进行比对,以保留时间 RT 值或相对保留时间 RRT 值定性,用峰面积外标法定量。

5.2 试剂

同 3.2。

5.3 仪器及器材

5.3.1 气相色谱仪:配有氢火焰离子化检测器(FID)和氮磷检测器(NPD)

5.3.2 其他同 3.3。

5.4 样品处理

取尿液或血清 1 mL 置于 10 mL 具塞离心管中,用 4 mol/L 氢氧化钠调 pH 13,用 2 mL 乙酸乙酯分别萃取两次,以 10 000 r/min 离心 3 min,有机层合并转移至另一试管中,于 40 °C 下氮气吹干,残留物用 200 μ L 甲醇溶解,取 1 μ L 进 GC 分析。

5.5 气相色谱测定

5.5.1 仪器参考条件

5.5.1.1 GC/FID 参考条件

包括:

- a) 色谱柱:5%苯基甲基聚硅氧烷石英毛细管柱,30 m \times 0.25 mm(内径) \times 0.25 μ m,或相当者。
- b) 流速:1.5 mL/min。
- c) 程序升温:120 °C 保持 2 min,以 45 °C/min 的速率升温至 280 °C,保持 5 min。
- d) 进样口温度:280 °C。
- e) 检测器温度:300 °C。
- f) 进样方式:分流,分流比:50 : 1。
- g) 进样量:1 μ L。
- h) 载气:氮气,纯度 \geq 99.999%;氢气流量:30 mL/min;空气流量:400 mL/min;尾吹气流量:25 mL/min。

5.5.1.2 GC/NPD 参考条件

包括:

- a) 色谱柱:5%苯基甲基聚硅氧烷石英毛细管柱,30 m \times 0.25 mm(内径) \times 0.25 μ m,或相当者。
- b) 流速:3 mL/min。
- c) 程序升温:100 °C 保持 2 min,以 20 °C/min 的速率升温至 250 °C。
- d) 进样口温度:280 °C。
- e) 检测器温度:340 °C。
- f) 进样方式:分流,分流比:30 : 1。

g) 进样量:1 μL 。

h) 载气:氮气,纯度 $\geq 99.999\%$;氢气流量:3 mL/min;空气流量:60 mL/min;尾吹气流量:10 mL/min。

5.5.2 标准曲线的绘制

取空白样品按照 5.4 处理。用所得的样品溶液将氯胺酮标准储备液(3.2.6)逐级稀释得到的浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、15 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液,浓度由低到高进样检测。以目标物的峰面积对浓度作图,得到校准曲线回归方程。基质匹配加标氯胺酮的样品 GC-FID 色谱图参见图 A.3,基质匹配加标氯胺酮的样品 GC-NPD 色谱图参见图 A.4。

5.5.3 定量测定

待测样液中氯胺酮的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进样分析。

5.5.4 结果计算

同 3.5.5。

5.6 空白试验

除不称取样品外,均按上述测定条件和步骤进行。

5.7 方法定量限

本方法中,GC-FID 法的定量限为 3 $\mu\text{g/mL}$,GC-NPD 法的定量限为 1 $\mu\text{g/mL}$ 。

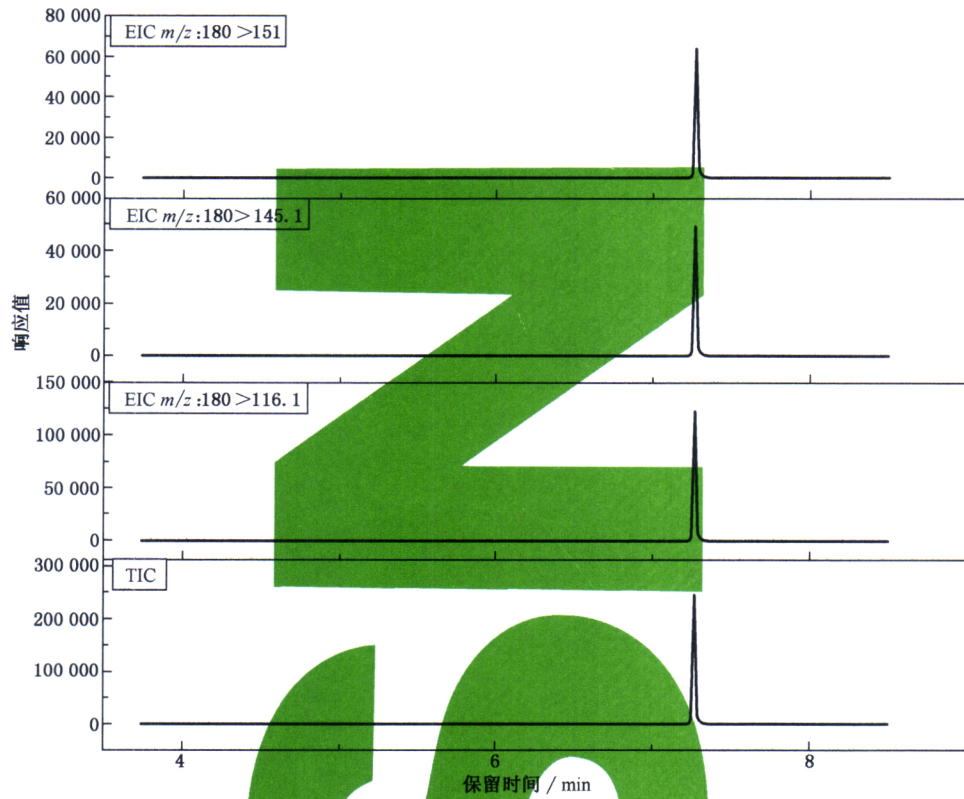
5.8 回收率

选择氯胺酮浓度低中高三个浓度水平分别为:5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 和 20 $\mu\text{g/mL}$,每个浓度水平采用五个平行样品进行氯胺酮标准样品添加回收以及精密度试验,结果表明其回收率均在 80%~120%之间,精密度均 $<10\%$ 。

5.9 允许差

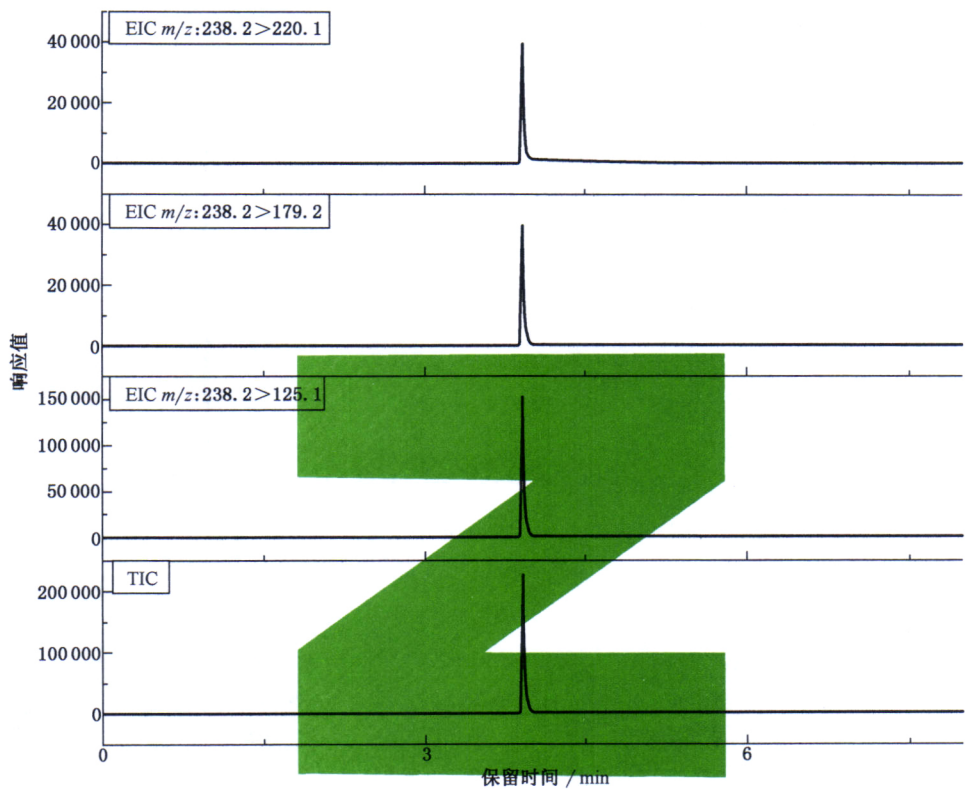
样品应按以上步骤同时平行测定两份,在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 10%时,定量数据可靠,按两份检材平均值给出定量结论。相对相差 $>10\%$,定量数据不可靠,需重新进行测定。

附录 A
(资料性附录)
氯胺酮的参考色谱图



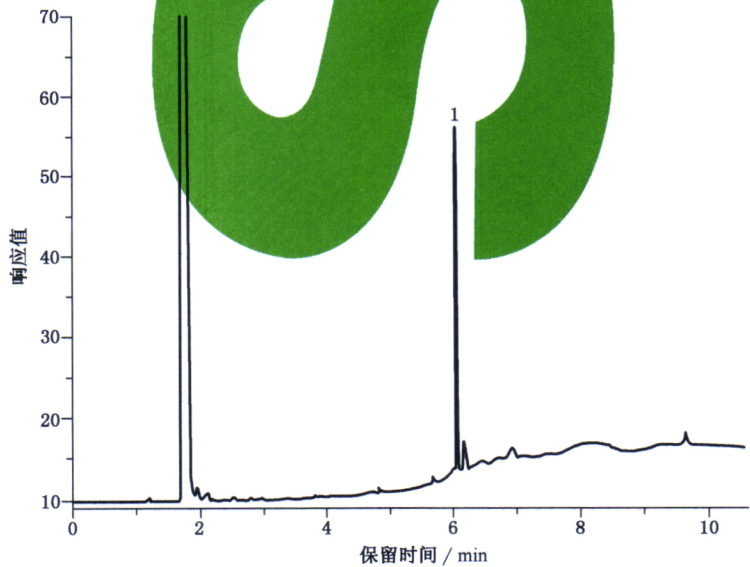
注：保留时间 7.373 min, 定性离子 m/z 180 > 116.1, m/z 180 > 151 和 m/z 180 > 145.1。

图 A.1 基质匹配加标氯胺酮样品 GC-MS/MS 多反应监测质量色谱图



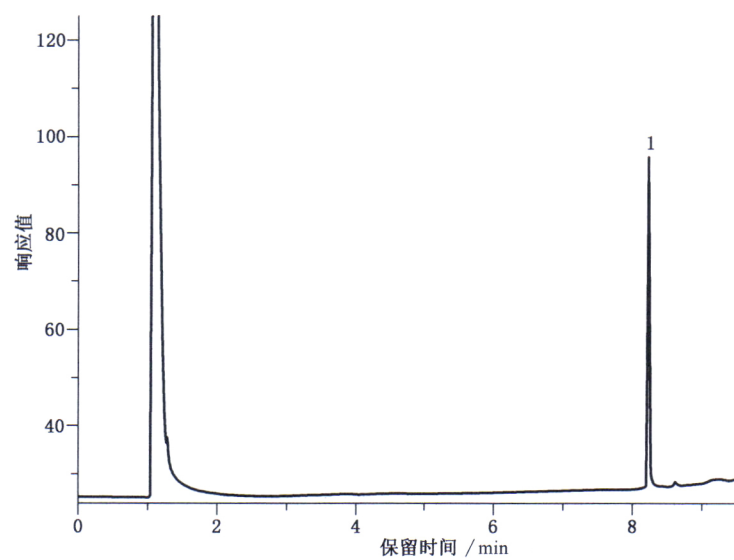
注：保留时间 3.89 min,定性离子 m/z 238.2>125.1、 m/z 238.2>179.2 和 m/z 238.2>220.1。

图 A.2 基质匹配加标氯胺酮样品 LC-MS/MS 多反应监测质量色谱图



注：图中峰 1 为氯胺酮色谱峰,保留时间 6.05 min。

图 A.3 基质匹配加标氯胺酮样品在 GC/FID 中的色谱图



注：图中峰 1 为氯胺酮色谱峰，保留时间 8.25 min。

图 A.4 基质匹配加标氯胺酮样品在 GC/NPD 中的色谱图