

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH PHÂN TÍCH NORKETAMIN TRONG MẪU NƯỚC TIỂU BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ KHÓI PHỔ (GC/MS)

Đến tòa soạn 3 - 9 – 2017

Đặng Đức Khanh, Nguyễn Thị Ngọc Minh

Viện Pháp y Quân đội

Nguyễn Văn Duy, Trần Thị Thúy

Trường ĐH Bách Khoa Hà Nội

SUMMARY

STUDY ON THE PROCESS OF ANALYSIS OF NORKETAMINE IN THE URINE SAMPLES BY GC/MS

In this study, analytical procedure of Norketamine, which is the metabolite of Ketamine, in urine using gas chromatography – mass spectrometry has been investigated. Ketamine-d4 was used as an internal standard and it has been added to sample before the extraction. C8 500 mg/3mL SPE column was used to extract analyst from each 5 mL urine sample. In SPE procedure 3ml methanol, 3ml deionizer water and 3ml 0.1M phosphate buffer pH were added in succession one by one. 3mL mixture of solvent was used each time to eluate analysts. The sensitivity of the analysis was increased by the HFBA derivatization. The selectivity of the method was validated, the RSD of repeatability was less than 10 %, the recovery of method was higher than 83%, the linearity range was from 250 to 10000ng/ml, limit of detection (LOD) of the method was 2.1 ng/mL. The analytical method has been successfully applied for the real suspected urine specimens, the concentration of Norketamine in positive samples were from 9.0ng/ml to 169.4ng/ml.

I. MỞ ĐẦU

Tình hình sử dụng trái phép các chất ma túy hiện nay diễn ra rất phức tạp, chủng loại ma túy và hình thức sử dụng rất đa dạng. Tệ nạn ma túy đã gây ra tác động tiêu cực cho xã hội, thiệt hại về kinh tế của gia đình và xã hội, làm cho người sử dụng suy giảm

sức khỏe, gây rối loạn nhân cách hành vi, mất khả năng học tập và lao động, mất an toàn khi tham gia giao thông...

Được đưa vào sử dụng trong y tế từ năm 1970, hiện nay, Ketamin bị lạm dụng như một ma túy khá phổ biến. Norketamin là chất chuyển hóa chính

của Ketamin. Do thời gian bán thải của Ketamin là 2,5 đến 3h, khoảng 95% Ketamin được sử dụng chuyển hóa thành các sản phẩm trung gian, khoảng 91% được đào thải qua nước tiểu nên việc xác định được Norketamin trong mẫu nước tiểu có ý nghĩa quan trọng trong xét nghiệm ma túy [2].

Phương pháp sắc ký khí khối phổ để phân tích Norketamin cho kết quả chính xác nhờ vào việc so sánh cả thời gian lưu và phổ khối của chất phân tích với chất chuẩn. Ngoài ra kỹ thuật tạo dẫn xuất giữa Norketamin với tác nhân dẫn xuất là HFBA sẽ làm tăng độ nhạy của thiết bị phân tích [1,3]. Trong nghiên cứu sử dụng cột chiết pha rắn (SPE) C8 loại 500mg – 3ml của hãng Agilent Technology để chiết và làm sạch chất phân tích trong mẫu nước tiểu. Quy trình sử dụng Ketamin-d4 (IS) làm chất nội chuẩn để cho vào mẫu nước tiểu trước khi tiến hành các bước xử lý mẫu trên SPE sẽ giúp loại ảnh hưởng sai số trong các thao tác phân tích, tăng độ chính xác của kết quả đo.

II. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu

Các hóa chất sử dụng gồm: axeton, diclometan, hexan, methanol, isopropanol, amoniac, HCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaOH, ethyl axetat, HFBA (heptafluorobutyric anhydride), khí nitơ, heli 99,999%, cột SPE C8 loại 500mg-3ml của hãng Agilent Technology, nước cất 2 lần...

Các hóa chất chuẩn gồm: Norketamin

HCl 1mg/ml methanol, Ketamin-d4 HCl nồng độ 0,1mg/ml methanol của hãng Cerilliant có mã lần lượt là Lot: FC 04301414 và FE 04141401.

Thiết bị phân tích sắc ký khí 6890N và khối phổ 5973i của hãng Agilent Technology.

Cột mao quản EVDX-5MS, dài 25m, đường kính 0,2mm, độ dày pha tĩnh 0,33 μm .

2.2. Quy trình xử lý mẫu nước tiểu

Thêm 50 μl chất nội chuẩn ketamin-d4 có nồng độ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vào 5ml mẫu nước tiểu đã ly tâm loại cần. Thêm tiếp 5ml dung dịch đệm 0,1M phosphate pH=6,0. Lắc mẫu khoảng 5 phút. Cột SPE được hoạt hóa lần lượt bằng 3 mL methanol, 3 mL nước deion, 1 mL đệm phosphate pH = 6,0. Tiến hành nạp mẫu nước tiểu qua cột SPE với tốc độ 1 - 2 mL/phút. Rửa tạp chất bằng 2ml H_2O deion, 1ml dung dịch 0,1M axit acetic, 3ml n-hexan, 1ml methanol. Chất phân tích được rửa giải bằng 3ml hỗn hợp dung môi Diclomethan : isopropanol : ammoniac = 78:20:2. Làm bay hơi đến cần và hòa lại bằng 100 μl ethylacetate. Thêm 50 μl chất dẫn xuất HFBA và gia nhiệt ở 70 °C trong thời gian 40 phút. Mẫu sau dẫn xuất được làm bay hơi dưới dòng khí nitơ đến cần và hòa tan lại bằng 100 μl Ethylacetate. Bơm 2 μl trên thiết bị sắc ký khí khối phổ.

2.3. Đánh giá quy trình

2.3.1. Độ chọn lọc của quy trình phân tích

Độ chọn lọc được thực hiện trên 03

mẫu nước tiểu khác nhau không có chứa chất ma túy. Quá trình xử lý mẫu nước tiểu được thực hiện theo đúng quy trình nêu tại mục 2.2.

2.3.2. Khảo sát độ ổn định của thiết bị GC/MS

Độ ổn định của thiết bị được khảo sát phân tích ở 03 điểm nồng độ của Norketamin đã dẫn xuất với HFB lần lượt là 250ng/ml; 2500ng/mL; 10000 ng/mL, nồng độ của Ketamin-d4 trong các điểm đều là 2500 ng/mL. Mỗi điểm nồng độ phân tích lặp lại 6 lần. Kết quả đánh giá thông qua giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD).

2.3.3. Khảo sát độ lặp lại của kỹ thuật tạo dẫn xuất

Độ lặp lại của kỹ thuật tạo dẫn xuất được tiến hành ở 2 điểm hàm lượng của Norketamin là 50 ng và 1000 ng, các mẫu đều có cùng một hàm lượng Ketamin-d4 là 250 ng, mỗi điểm nồng độ dẫn xuất lặp lại 6 mẫu. Điều kiện dẫn xuất thực hiện theo đúng quy trình.

2.3.4. Khoảng tuyến tính và giới hạn phát hiện

Khoảng tuyến tính của Norketamin được khảo sát trong khoảng nồng độ từ 250ng/ml đến 10000ng/ml. Chất nội chuẩn trong các điểm đều là 2500ng/ml Đường chuẩn nội được dựng dựa vào phân tích 6 điểm nồng độ của Norketamin lần lượt là 250, 1250, 2500, 5000, 7500 và 10000 ng/mL. Nồng độ của Ketamin-d4 ở các điểm đều là 2500 ng/mL. LOD được tính dựa vào tỷ lệ giữa tín hiệu chiều cao pic so với nhiễu đường nền thông qua phân tích mẫu chuẩn pha

loãng dần trong dịch chiết mẫu trắng, khi đó LOD được tính là $S/N = 3$, $LOQ = 3,3 LOD$.

2.3.5. Độ thu hồi của quy trình phân tích

Độ thu hồi được đánh giá và so sánh giữa mẫu nước tiểu thêm chuẩn Norketamin sau khi qua cột SPE và mẫu chuẩn không qua cột SPE ở cùng nồng độ, mỗi điểm thí nghiệm tiến hành lặp lại 6 mẫu. Mẫu nước tiểu thêm hàm lượng chuẩn Norketamin để có các nồng độ lần lượt là 10 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/mL nước tiểu (tương ứng với hàm lượng Norketamin là 50, 500, 1000 ng). Mẫu được xử lý theo quy trình đã nêu tại mục 2.2, chất nội chuẩn được thêm vào trước khi dẫn xuất mẫu.

2.3.6. Độ lặp lại của quy trình phân tích

Độ lặp lại của quy trình phân tích được thực hiện trên mẫu nước tiểu thêm chuẩn có các nồng độ là 10,0; 100,0 và 200,0 ng/mL. Mỗi nồng độ phân tích lặp lại 6 lần và tính giá trị RSD%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Điều kiện phân tích sắc ký khí khối phổ

Các điều kiện phân tích của thiết bị GC/MS được đưa ra như sau: Chương trình nhiệt độ cột tách: Nhiệt độ ban đầu 70 °C, giữ đẳng nhiệt 2 phút, tăng 20 °C/phút đến 140 °C giữ đẳng nhiệt 2 phút, tăng 4 °C/phút đến 260 °C giữ 5 phút. Tổng thời gian sắc ký là: 42,5 phút. Ion hóa và chạm điện tử ở 70eV. Nhiệt độ buồng bơm mẫu 250 °C. Tốc độ dòng khí heli là

0,8ml/phút. Bơm mẫu không chia dòng.

Từ kết quả phân tích Scan mẫu chuẩn Norketamin và Ketamin-d4 có nồng độ 5µg/mL được dẫn xuất với HFBA đã xác định được thời gian lưu và tỷ lệ các mảnh phổ cần phân tích. Kết quả phân tích chỉ ra trong bảng 1.

Bảng 1. Mảnh phổ m/z của Norketamin, Ketamin-d4 sau khi dẫn xuất HFBA.

TT	Tên chất	Mảnh ion (m/z)	t _R
1	Norketamin-HFBA	356 ₁₀₀ , 384 ₉₆ , 377 ₁₅	21,19
2	Ketamin-d4-HFBA	374 ₁₀₀ , 366 ₈₈ , 240 ₆₀	24,79

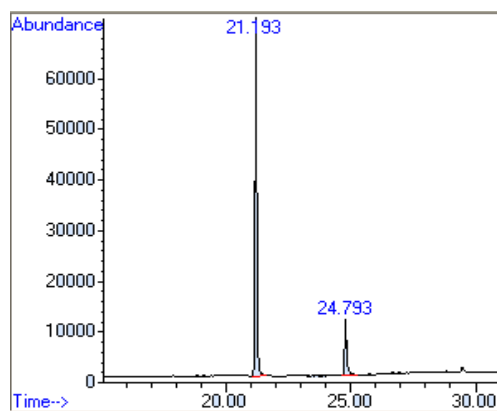
(*)-t_R: Thời gian lưu của chất phân tích (phút)

Trên sắc ký đồ phân tích mẫu chuẩn ở hình 1 chỉ ra thời gian lưu của Norketamin-HFB là 21,193 phút và Ketamin-d4-HFB là 24,793 phút.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ ổn định của thiết bị dựa vào thời gian lưu và tỷ lệ diện tích pic

Tỉ lệ nồng độ (ng/ml) Norketamin/IS	Số liệu thống kê (n = 6)	t _R Nor-HFB	Tỷ lệ diện tích pic Norketamin/ IS
250/2500	Trung bình	21,190	0,338
	SD	0,006	0,006
	RSD (%)	0,03	1,909
2500/2500	Trung bình	21,171	8,148
	SD	0,004	0,119
	RSD (%)	0,020	1,457
10000/2500	Trung bình	21,180	32,063
	SD	0,010	0,625
	RSD (%)	0,046	1,950

Từ kết quả trong bảng 2 cho ta thấy sự sai khác giữa các lần đo thấp (RSD < 2%). Trong nghiên cứu chất nội chuẩn là Ketamin-d4 đã được sử dụng, do đó kết quả tính tỷ lệ diện tích pic của chất phân tích chia cho



Hình 1. Sắc ký đồ (TIC) chuẩn

Norketamin-HFB và ketamin-d4-HFB

3.2. Kết quả khảo sát độ ổn định của GC/MS

Độ ổn định của thiết bị phân tích GC/MS được đánh giá thông qua kết quả tính toán độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của 2 yếu tố là thời gian lưu (t_R) của Norketamin-HFB và tỷ lệ diện tích pic của chất phân tích Norketamin-HFB chia cho chất nội chuẩn Ketamin-d4-HFB. Kết quả được chỉ ra trong bảng 2.

chất nội chuẩn không bị ảnh hưởng bởi sai số của thể tích bơm mẫu.

3.3. Khảo sát độ chọn lọc của phương pháp

Khảo sát độ chọn lọc của quy trình được thực hiện trên 03 mẫu nước tiểu

khác nhau không có chất phân tích. Kết quả phân tích cho thấy trên sắc ký đồ không có pic trùng với pic của Norketamin-HFB và Ketamin-d4-HFB trong mẫu chuẩn.

3.4. Độ lặp lại của kỹ thuật dẫn xuất

Độ lặp lại của kỹ thuật dẫn xuất được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối của tỷ lệ diện tích pic của Norketamin-HFB chia cho Ketamin-d4-HFB. Các mẫu chuẩn được dẫn xuất với HFBA ở cùng một điều kiện nhiệt độ là 70°C và thời gian là 40 phút. Sau khi dẫn xuất định mức thể tích là 100µl.

Kết quả phân tích chỉ ra trong bảng 3 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối của kỹ thuật tạo dẫn xuất thấp ($RSD < 10\%$) tương ứng ở các điều kiện nhiệt độ và thời gian dẫn xuất ứng với 2 mức hàm lượng Norketamin khác nhau. Kết quả chỉ ra sự sai khác giữa các lần dẫn xuất là ít, độ biến động thấp. Giá trị RSD càng thấp thì độ chính xác của các lần dẫn xuất càng cao.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại của kỹ thuật tạo dẫn xuất

Tỷ lệ hàm lượng (ng) Norketamin/IS	Số liệu thống kê (n = 6)	Tỷ lệ diện tích pic Norketamin/IS
25/250	Trung bình	0,340
	SD	0,016
	RSD (%)	4,792
1000/250	Trung bình	32,045
	SD	1,378
	RSD (%)	4,299

3.5. Khoảng tuyến tính và LOD, LOQ

Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính đưa ra được đồ thị và phương trình hồi

quy biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa tỷ lệ diện tích pic của chất phân tích chia cho chất nội chuẩn và tỷ lệ lượng chất phân tích chia cho chất nội chuẩn. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính cho ta biết phương trình hồi quy của Norketamin là $Y = 8,124X - 0,272$, $R^2 = 0,999$, $LOD = 2,1\text{ng/ml}$ và $LOQ = 7,0\text{ng/ml}$ (trong đó Y là tỷ lệ diện tích pic của Norketamin chia cho IS, X là tỷ lệ lượng chất của Norketamin chia cho IS).

3.6. Độ thu hồi của phương pháp phân tích

Độ thu hồi của quy trình phân tích Norketamin trong mẫu nước tiểu được thể hiện trong bảng 4. Từ kết quả thực nghiệm thể hiện trên bảng 4 ta thấy độ thu hồi của quy trình phân tích Norketamin trong mẫu nước tiểu là tốt ($R > 80\%$).

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ thu hồi của quy trình phân tích

TT	Độ thu hồi của Norketamin (n=6)		
	Lượng thêm vào (ng)	Lượng tìm thấy (ng)	R(%) trung bình
1	50,0	41,88	83,7
2	500,0	422,92	84,6
3	1000,0	871,78	87,2

3.7. Độ lặp lại của quy trình phân tích

Độ lặp lại của quy trình phân tích được thể hiện trong bảng 5. Kết quả giá trị $RSD < 15\%$ cho thấy độ lặp lại là tốt khi phân tích mẫu nước tiểu có nồng độ từ 10 đến 200 ppb. Kết quả đạt được do việc sử dụng Ketamin-d4 là chất nội chuẩn cho vào mẫu nước tiểu ngay từ đầu trước khi xử lý đã

loại được sai số do sự mất mẫu trong quá trình xử lý.

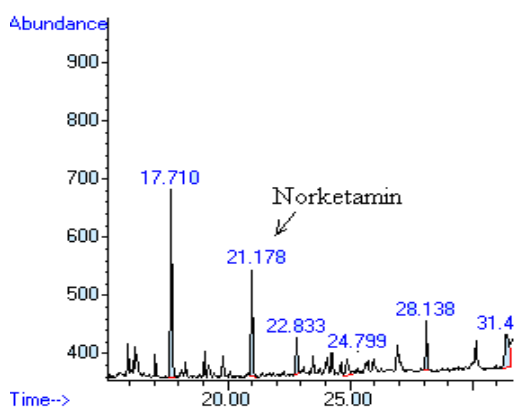
Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại của quy trình.

Mẫu(*)	Tỷ lệ diện tích pic trung bình, (n=6)	SD và RSD (%)
10 ng/ml	1,310	0,121; 9,243
100 ng/ml	15,345	1,304; 8,500
200 ng/ml	31,241	1,552; 4,967

(*): Nồng độ của Norketamin trong mẫu nước tiểu

3.8. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Mẫu nước tiểu thu được từ các trường hợp xét nghiệm ma túy được phân tích Norketamin theo quy trình nghiên cứu. 21 mẫu nước tiểu cho kết quả dương tính với Norketamin có nồng độ trong khoảng 9,0 đến 169,4 ng/mL. Hình 4 chỉ ra sắc ký đồ phân tích mẫu nước tiểu thực tế có Norketamin.



Hình 4. Sắc ký đồ phân tích mẫu nước tiểu thực tế

IV. KẾT LUẬN

Đã xây dựng quy trình phân tích chất chuyển hóa của Ketamin là Norketamin trong mẫu nước tiểu bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ sử dụng cột SPE C8 để xử lý mẫu và tạo dẫn xuất bằng tác nhân HFBA làm tăng độ nhạy của thiết bị phân tích. Quy trình phân tích đã được thẩm định thông qua các thông số như độ chọn lọc, độ thu hồi ($R > 83\%$), độ lặp lại có $RSD < 10\%$ khi phân tích Norketamin trong mẫu nước tiểu có nồng độ từ 10 đến 200 ppb, khoảng tuyến tính khảo sát trong khoảng nồng độ từ 250ng/ml đến 10000ng/ml Norketamin, LOD là 2,1ng/mL, LOQ là 7,0 ng/mL.

Đã ứng dụng thành công quy trình xây dựng vào phân tích Norketamin trong mẫu nước tiểu thực tế xét nghiệm. Có 21 mẫu phát hiện thấy Norketamin cho kết quả trong khoảng 9,0 đến 169,4 ng/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Hùng Việt. Sắc ký khí cơ sở lý thuyết và khả năng ứng dụng. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, 2005.
2. Paul I. Dargan, David M. Wood. Novel Psychoactive Substances. Academic press. 2013.
3. Jehuda Yinon. Forensic application of mass spectrometry, CRC press.1995.