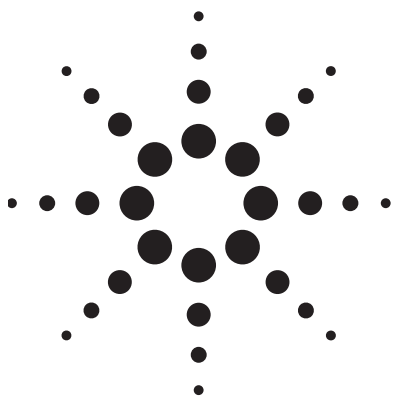




用 ZORBAX Eclipse Plus C18 柱对阿片类、可卡因及可卡因代谢物进行液相色谱/质谱测定

应用

法医学

作者

Patrick Friel B.S.和 Ann Marie Gordon M.S.

法庭科学实验室服务局

华盛顿州毒物学实验室

Washington State Patrol

2203 Airport Way South, Suite 360

Seattle, WA 98134

USA

摘要

本文报道了一种改进的测定阿片类化合物、可卡因和可卡因代谢产物的分析方法，血液样品经固相萃取后，进行 LC/MS 测定。采用 Eclipse Plus C18 柱对药物及其代谢产物进行分离。这种色谱柱所提供的出色峰形和分离度，加上 LC/MS 具有的灵敏度和选择性，使得只要进行简单的固相萃取，不用衍生，就可以在在一次分析中对这些药物和代谢产物进行分离和定量。

引言

提交到华盛顿州毒物学实验室的血样中，20% 以上都对阿片类化合物、可卡因代谢物的免疫筛选呈阳性。死亡调查和药物滥用所致拘留占大多数，也包含少数性侵犯。各案例之间的药物浓度有很大差别，待测物呈现出多种不同的组合。理想的确认分析应该可以在一次血样分析中测定所有阿片类化合物、可卡因和可卡因代谢物，并具有高灵敏度和宽线性动态范围。直到最近，气相色谱-质谱还是这种确认的行业标准，但是这种方法要对样品进行衍生化，甚至需要两次衍生[1]。

在华盛顿州毒物学实验室，我们用安捷伦 MSD SL 和新的 ZORBAX Eclipse Plus C18 柱，采用液相色谱/质谱法(LC/MS)，对几千个案例中的阿片类化合物、可卡因和可卡因代谢物进行了分析。与我们以前用的 GC/MS 方法相比，这一方法有许多优点，包括样品处理更简便、灵敏度更高，可以在一次分析中检测更宽范围的阿片类化合物。



Agilent Technologies

实验部分

方法

提取

净化筛分萃取柱（联合化学技术公司，CSDAU206）预处理

1 × 3 mL 甲醇
1 × 3 mL 去离子水
1 × 3 mL 0.1 M KH_2PO_4

血样制备

（标准品：加入工作标准液并先干燥）
50 μL 内标（乙基吗啡 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）
1 mL 血液
3 mL 0.1 M KH_2PO_4
漩涡混合并离心，2,500 rpm 15 分钟

以 1 到 2 mL/min 的流速将稀释、离心后的血液加到平衡好的净化柱上。

洗柱

1 × 3 mL 蒸馏水
1 × 3 mL 0.1 N HCl
1 × 3 mL 甲醇
在高真空下干燥 10 分钟

洗脱

1 × 3 mL CH_2Cl_2 /异丙醇/ NH_4OH (72/26/2)
（每天新鲜配制/现用现配）

蒸发 @ 50° (~ 20 分钟) 并用 100 μL 1% 冰醋酸复溶

色谱和仪器条件

仪器：	Agilent 1100 LC/MSD SL
色谱柱：	ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm x 150 mm, 5 micron (Agilent 部件号 959993-902)
流动相：	A: 1% 冰醋酸 B: 乙腈 开始: 3% B 16.5 分钟时 40% B 17 分钟时 40% B 20 分钟时 3% B 32 分钟时 3% B
流速：	1 mL/min
柱温：	60 °C
进样体积：	2.5 μL
清洗针头：	1% 冰醋酸

MS 条件

离子源：	电喷雾
电离模式：	正电离
Vcap：	3,000 V
雾化器：	40 psig
干燥气流量：	13 L/min (氮气)
干燥气温度：	350 °C
质量范围：	SIM, 3 组 第 1 组 (1.0 到 4.8 分钟) 209, 227, 284, 257, 第 2 组 (4.8 到 8.1 分钟) 181, 241, 268, 298, 300, 314, 316, 328 amu 第 3 组 (8.1 到 17 分钟) 168, 196, 272, 290, 291, 304, 318 amu
裂解器：	第 1 组和第 2 组: 260 V; 第 3 组: 220 V

结果和讨论

表 2 列出本方法中化合物的保留时间和所用的离子。安捷伦应用报告 988-4805EN[2] 中给出了这些化合物的化学结构。将原始数据文件从 LC/MSD 计算机转入另一个计算机，用安捷伦 MSD 化学工作站进行数据分析（Agilent LC/MS 数据文件与 MSD 化学工作站完全兼容）。对每个待测物，有一个目标质量数是加质子形成的准分子离子 ($\text{M}+\text{H}$)。为了使碰撞诱导裂解能得到足够的确认离子丰度，采用了较高的裂解器电压。每个化合物至少监测两个质量数，每个离子比值的限定范围设定在 $\pm 25\%$ [3]。当一个化合物监测两个离子时，将同位素离子 ($\text{M}+2$) 作为第三个离子，但其不能和代表目标分子已知碎片的确认离子一样，提供足够多的信息。在这种情况下，形成的加钠离子 ($\text{M}+\text{H}+22$)，就不一定能作为确认离子。对照血样提取物的色谱图见图 1。

表 3 列出了本方法的检出限、定量限和线性，以及 6 个月内采集的质控数据。实验室的方针是将血液药物控制的合格范围设置在内部测定平均值的 $\pm 20\%$ 。所有常规测试分析物的校正曲线相关系数 (r^2) ≥ 0.990 。除吗啡-3-葡萄糖酸和吗啡-6-葡萄糖酸外，所有分析物的回收率为均大于 90%。吗啡葡萄糖酸的回收率较低 (-1%)。提取物进样后没有洗针时，前一针进样的交叉污染比较明显，但方法中加入洗针后，浓度高达 10,000 ng/mL 或更大，都不再有交叉污染。

表2. 被分析物的保留时间和监测的离子(准分子离子用粗体表示)

化合物	保留时间 (分钟)	监测的离子
乙基吗啡(I.S.)	7.47	314 , 257
吗啡	2.96	286 , 227, 209
氢吗啡酮	3.83	286 , 227
可待因	5.55	300 , 241, 181
羟可酮	6.18	316 , 298, 241
6-乙酰吗啡	6.4	328 , 268
氢可酮	6.61	300 , 241
苯甲酰芽子碱	8.62	290 , 168
可卡因	10.3	304 , 272
古柯乙烯	11.94	318 , 196
研究的化合物		
吗啡-3-葡萄糖酸苷	1.93	462 , 286
吗啡-6-葡萄糖酸苷	2.8	462 , 286
羟吗啡酮	3.34	302 , 284, 227

我们的方法是在 Pichini 等人[4]所报道方法的基础上建立的。我们尝试加入阿片类化合物, 不改动其分析步骤, 但羟可酮、氢吗啡酮和氢可酮出现严重的不对称峰。这一问题在以前的文献中已有报道, 认为是与流动相成分形成多种加合产物/复合物的结果[5]。使

用高效 Eclipse Plus 柱, 采用较高的温度(60 °C), 有效地改善了这些有问题分析物的峰形(图1)。

用一份提取物分析尽可能多的阿片类化合物, 不仅大大节省了时间和经费, 而且还有其它好处。用这一方法可进行细胞色素 P450 2D6 代谢产生的可待因、氢可酮、羟可酮的次级活性代谢产物(分别来自吗啡、氢吗啡酮和羟吗啡酮[6])的常规监测。这些活性代谢物的信息可能对评价总的阿片/麻醉作用有帮助, 也有助于区分急性和慢性药物接触。这种 LC/MS 方法, 可以在下列三种不同情况下检测到氢吗啡酮: (1)服用氢吗啡酮后; (2)作为氢可酮的次级代谢物; (3)大剂量服用吗啡后的次级代谢物[7]。

本方法中, 选择乙基吗啡作为内标, 因为我们用单级四极杆仪器测定的某些氘代内标, 碎裂时产生和其同系列目标化合物一样的离子。如果本方法使用的是串联 LC/MS 系统, 很多氘代内标都可以用, 得到的结果甚至可能比这里报告的准确度和精密度更高。

羟可酮和吗啡-3-葡萄糖酸苷、吗啡-6-葡萄糖酸苷的分析还只用于研究。尽管回收率较低, 但和吗啡一起测定吗啡-3 和吗啡-6-葡萄糖酸苷对判断急慢性药物摄取差异颇有价值。在一起与吗啡相关的致死案例中, 一位寻求刺激的少年服用了一位年长妇女开具的持续

表3. 方法检出限、定量限、线性限和质控数据

化合物	检出限 ng/mL	定量限 ng/mL	线性限上限	控制浓度	CV%
乙基吗啡(I.S.)	-	-	-	-	-
吗啡	5	5	2000	41 92	10% 7%
氢吗啡酮	1	2	400	8	8%
可待因	5	5	2000	49 97	6% 5%
羟可酮	5	5	2000	45 258	6% 4%
6-乙酰吗啡	1	2	200	4	6%
氢可酮	5	5	2000	52 94	4% 6%
苯甲酰芽子碱	25	100	5000	114 672	10% 8%
可卡因乙烯	5	5	2000	61 84	7% 6%
古柯	5	5	2000	64 88	11% 8%

释放吗啡的未知制剂。LC/MS 分析显示尸检血液中吗啡浓度超过 700 ng/mL，但吗啡葡萄糖酸苷的浓度却较低。相反，对长期摄入吗啡的癌症死亡病人尸检，吗啡葡萄糖酸苷的浓度通常要比前体药物浓度高一个数量级。增加本方法洗脱溶剂中异丙醇的比例，可以提高吗啡葡萄糖酸苷的回收率。用更简单的疏水固相萃取柱提取[2]，而不是用本方法报道的疏水/阳离子交换柱，吗啡葡萄糖酸苷的回收率很高，但缺点是背景信号增高，柱寿命降低。另一种能够满足要求的提取方法是采用聚合固相柱，用 5% 氢氧化铵甲醇洗脱，吗啡及其葡萄糖酸苷的回收率较高[8]。

本方法中羟可酮的回收率很高，因为其最近已被 FDA 批准作为一种高效口服阿片类镇痛剂[9]，所以还有必要对羟可酮进行进一步研究。用本方法还能测定一些其它阿片类代谢物。曾有报道，氢可酮代谢为氢吗啡酮，但也代谢为二氢可待因和 norhydrocodone。羟可酮代谢为羟吗啡酮，也代谢为 α -和 β -oxycodol、

noroxycodol，以及其它产物。选择哪种代谢物进行测定是比较复杂的。如前所述，高效阿片代谢物可能仍然具有其前体药物的作用，但最近 Danny Shen 博士实验室有关羟可酮的数据对这一说法提出了质疑[10]。即使代谢物不具备其前体的药理学活性，它们也还可能有毒理学意义，例如，有助于区分急性和慢性使用药物。

测定另一个可卡因代谢物芽子碱甲酯时，用本文报道的固相萃取提取，但回收率不稳定，原因可能是在蒸发过程中有损失。由于回收率容易改变，用本方法对芽子碱甲酯进行定量分析需要使用氘代内标。

改进本方法的另一个办法是使用 shim 喷雾器（安捷伦部件号 G1946-20307），这是为流动相流速高时提高离子传输进入毛细管的效率而设计的。可以提高本方法的分析灵敏度，使用的流动相流速为 1.0 mL/min。

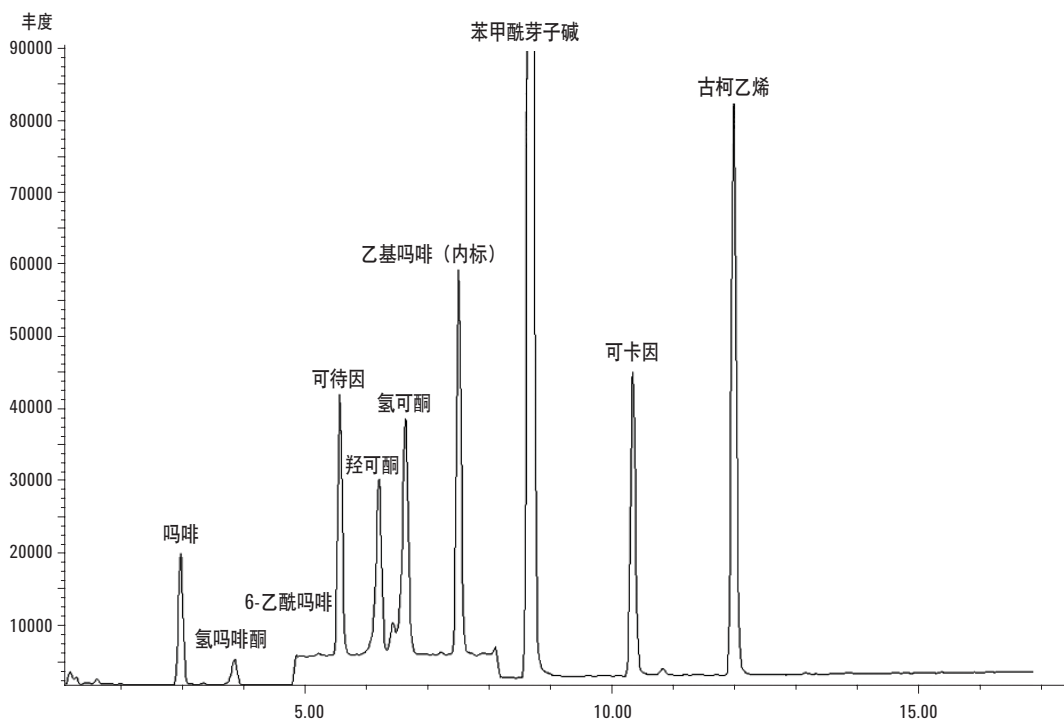


图 1. 含吗啡(41 ng/mL)、氢化吗啡(8 ng/mL)、可待因(49 ng/mL)、oxycodone (45 ng/mL)、6-乙酰吗啡(4 ng/mL)、hydrocodone (52 ng/mL)、benzoylecgonine (672 ng/mL)、可卡因(61 ng/mL)和 cocaethylene (64 ng/mL)的质控血样提取物的总离子流图

结论

本文介绍了一种分析血样中阿片类化合物、可卡因和可卡因代谢物的方法, 样品经混合固定相固相萃取后, 用电喷雾单级四极杆 LC/MS 测定。本方法优于我们以前报道的 GC/MS 方法, 不需要衍生化, 检出限和定量限更低, 所能测定的阿片类化合物范围更宽。另外, 在较高的温度下使用高效 ZORBAX Eclipse Plus C18 HPLC 柱, 克服了以前遇到的阿片类化合物峰形差的问题。

参考文献

1. L. A. Broussard, L. C. Presley, M. Tanous, and C. Queen. "Improved Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for Simultaneous Identification and Quantification of Opiates in Urine as Propionyl and Oxime Derivatives." *Clin. Chem.*, 2001 Jan;47(127-129).
2. S. A. Schlueter, J. D. Hutchison, J. M. Hughes. "Determination of Opiates and Metabolites in Blood Using Electrospray LC/MS." Agilent Application Note 988-4805EN.
3. L. Rivier. "Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis." *Analytic Chimica Acta* 492, 2003 (69-82).
4. S. Pichini, R. Pacifici, M. Pellegrini, E. Marchei, E. Perez-Alarcon, C. Puig, O. Vall, O. Garcia-Algar. "Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of opiates and cocaine in meconium." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2003 Sep 5;794(2):281-92.
5. K. Brogle, R. M. Orna, D. Wu, P. J. Palermo. "Peak fronting in reversed-phase high-performance liquid chromatography: a study of the chromatographic behavior of oxycodone hydrochloride." *J Pharm Biomed Anal.*, 1999 Apr;19(5):669-78.
6. G. Mikus, J. Weiss. "Influence of CYP 2D6 genetics on opioid kinetics, metabolism, and response." *Current Pharmacogenomics*, 2005 (3):43-52.
7. E. J. Cone, H. A. Heit, Y. H. Caplan, D. Gourlay. "Evidence of morphine metabolism to hydromorphone in pain patients chronically treated with morphine." *J Anal Toxicol.*, 2006 Jan-Feb; 30(1):1-5.
8. C. M. Murphy, M. A. Huestis. "LC-ESI-MS/MS analysis for the quantification of morphine, codeine, morphine-3-beta-D-glucuronide, morphine-6-beta-D-glucuronide, and codeine-6-beta-D-glucuronide in human urine." *J Mass Spectrom*, 2005 Nov;40(11):1412-6.
9. Endo Receives FDA Approval for Opana(R) ER (oxymorphone HCl) Extended-Release and Opana(R) (oxymorphone HCl) Immediate Release Tablets CII. (24 Jun 2006) (<http://www.medicalnewstoday.com/medicalnews.php?newsid=45874>).
10. B. Lalovic, E. Kharasch, C. Hoffer, L. Risler, L. Y. Liu-Chen, D. D. Shen. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral oxycodone in healthy human subjects: role of circulating active metabolites." *Clin Pharmacol Ther.*, 2006 May;79(5):461-79.

更多信息

如需进一步了解有关我们产品和服务的更多信息，
请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

本文中所含信息仅适用于研究，不可用于诊断。

安捷伦对本资料中的错误，及因使用本资料所引发的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、介绍和性能指标如有更改恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2007

2007年8月，中国印刷
5989-5906CHCN



Agilent Technologies