

采用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 和 Agilent Poroshell 120 色谱柱对全血中的丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡进行 LC/MS/MS 分析

应用报告

法医学与药物测试

作者

Irina Dioumaeva
安捷伦科技有限公司

摘要

法医和疼痛科实验室进行全血中丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的检测时，需要一种能在浓度低于 1 ng/mL 的水平内可靠检测这些化合物的分析方法。一种简单的样品净化步骤，结合使用离子对 468.2→55.1 和 414.2→83.1 的 LC/MS/MS 方法，可实现两种分析物的检测限（LOD）低于 0.1 ng/mL。每种分析物校正曲线的线性范围为 0.2 到 20 ng/mL，其 R^2 等于或大于 0.999。采用安捷伦新一代产品分析可获得更高的检测灵敏度。这些产品包括 Agilent Bond Elut Plexa PCX 混合模式聚合物 SPE 吸附剂、Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.7 μm 表面多孔填料 LC 柱、Agilent 1200 Infinity LC 系统、以及配备了安捷伦喷射流技术（AJST）增强型电喷雾离子源的 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 系统。



Agilent Technologies

引言

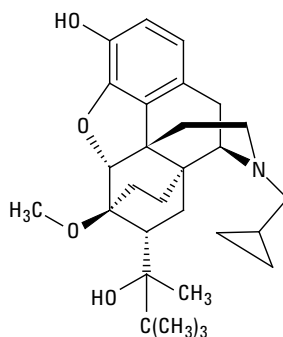
丁丙诺啡是一种半合成的鸦片样药物，用于治疗慢性疼痛，以及作为美沙酮的替代品治疗阿片成瘾。作为镇痛剂，丁丙诺啡的效果大约是吗啡的 25 到 40 倍。丁丙诺啡的结构与吗啡相似，但疏水性更强（见图 1）。丁丙诺啡在肝脏中存在 N-脱烷基化反应，产生其主要活性代谢物——去甲丁丙诺啡。丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡在血液中的浓度非常相近，50% 以上病例中的浓度低于 1 ng/mL (Selden 等, 2011)，给分析人员的检验带来了极大的挑战。此外，由于这些分析物分子结构稳定性强，碰撞诱导裂解产生的碎片量少，因此对这些化合物进行 MS/MS 分析很困难。为了实现检测灵敏度低于 1 ng/mL，检测这些化合物的分析方法不仅要有出色的 MS 性能，还要有一个回收率高、离子抑制低的有效样品净化程序。我们使用 SPE 处理的全血提取物洁净度高，较容易地实现了检测限低于 0.1 ng/mL。与其它聚合物吸附剂不同，所有 Agilent Bond Elut Plexa 系列产品的颗粒均具有不含氨基的羟基化表面，消除了对蛋白质的吸附，从而获得了最低的离子抑制和最高的检测灵敏度。又由于填料粒径分布窄且没有粉末造成堵塞，还实现了高流速和良好的重现性。

利用该方法可实现分析物的良好分离和极佳的峰形，这是采用 Agilent Poroshell 120 系列色谱柱进行分析的特色。采用表面多孔的 2.7 μm 填料，这些色谱柱具有与亚 2 μm UHPLC 色谱柱相似的柱效，但背压却降低了约 40%。这就允许用户甚至可以使用 400 bar LC 系统来提高分离度，并且通过使用更高的流速来缩短分析和再平衡时间。

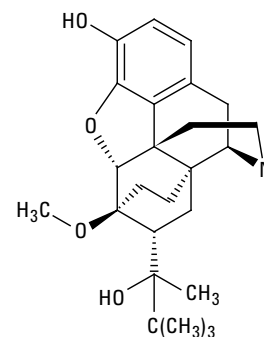
本文定量分析使用的经鉴定具有最高丰度的新离子对是 468.2 > 55.1 (丁丙诺啡) 和 414.2 > 83.1 (去甲丁丙诺啡)。该方法仅需 0.5 mL 血样，采用 10 μL 较低的进样体积和提取时 5 倍预浓缩，即可在 0.2 ng/mL 浓度时实现良好的信噪比：丁丙诺啡为 84 : 1，去甲丁丙诺啡为 20 : 1 (见图 2)。

实验部分

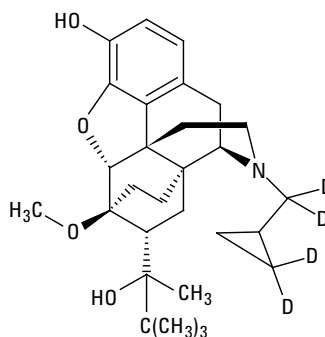
分析物



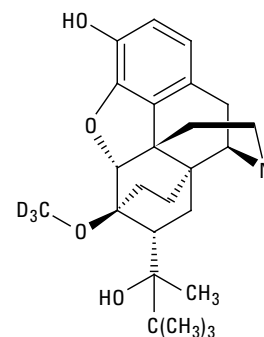
丁丙诺啡
 $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{NO}_4$ M.W. 467.65
Log P 4.9-5.0
pKa 8.3



去甲丁丙诺啡
 $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_4$ M.W. 413.55
Log P 3.4-3.8



丁丙诺啡-D₄
 $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{D}_4\text{NO}_4$ M.W. 471.62



去甲丁丙诺啡-D₃
 $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{D}_3\text{NO}_4$ M.W. 416.53

图 1. 分析物丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡及其结构。log P 和 pKa 值来自 SRC 和 PubChem

药物标准品为 1 mg/mL (丁丙诺啡、去甲丁丙诺啡) 和 100 $\mu\text{g/mL}$ (丁丙诺啡-D₄ 和 去甲丁丙诺啡-D₃) 的甲醇溶液，购自 Cerilliant 公司。

材料和仪器

SPE

- Agilent Bond Elut Plexa PCX 小柱, 30 mg, 3 mL (部件号 12108303)
- 安捷伦真空多管装置 VacElut 20 (部件号 12234100)
- 安捷伦活塞阀 (部件号 12234520)
- 安捷伦硅烷化自动进样瓶, 2 mL (部件号 5183-2072)
- 安捷伦样品瓶内插管, 250 μ L, 脱活玻璃, 聚合物底座 (部件号 5181-8872)
- 安捷伦螺旋盖, 用于 AS 样品瓶 (部件号 5182-0717)

LC

- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 \times 50 mm, 2.7 μ m 色谱柱 (部件号 699975-302)
- Agilent 1260 Infinity LC 系统 (G1379B 微量脱气机、1312B 低延迟体积二元泵、G1367E 自动进样器、G1330B 柱温箱)

MS

- Agilent 6460A 三重四极杆 LC/MS 系统, 配备 AJST 电喷雾离子源

样品制备

预处理

- 将适量 ISTD 加入 0.5 mL 血样中, 使浓度为 10 ng/mL, 或采用 0.1 M 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 配制 10 ng/mL 的 ISTD 溶液, 并在每份血样中加入 0.5 mL 此内标缓冲液。推荐使用甲醇清洗并晾干的 12 \times 75 mm 玻璃管
- 加入 ISTD 后, 加入 2 至 2.5 mL 磷酸盐缓冲液 (血样至少被稀释了 5 倍)
- 涡旋后离心, 使沉淀完全

萃取

- 采用 0.5 mL 甲醇活化 Bond Elut Plexa PCX 小柱浸泡, 然后使其自然滴落
- 上样/使用 Pasteur 玻璃吸量管吸取上清液
- 淋洗 1: 2 \times 2 mL 2% 甲酸溶液
- 淋洗 2: 3 mL 甲醇/2% 甲酸溶液 (70 : 30)
- 真空干燥 5-10 min (10-15 in Hg)

- 用 1.5 mL 乙酸乙酯/异丙醇/氨水 (80/20/5) 混合液洗脱。在洗脱即将开始前加入氨水。将洗脱液分成两等份, 依次浸泡吸附剂。关闭活塞阀浸泡约 0.5 min 后, 打开活塞阀让洗脱液在重力作用下滴入收集瓶中。当洗脱液不再滴落时, 使用低真空抽取吸附剂小孔中的洗脱液

- 45 $^{\circ}$ C 下氮气吹干

- 用 0.1 mL 初始流动相 (15% 甲醇、85% 水、0.1% 甲酸) 复溶残渣, 涡旋后转移至带聚合物底座的样品瓶内插管中

LC/MS/MS

LC 条件

流动相 A	0.1% 甲酸水溶液	
流动相 B	0.1% 甲酸甲醇溶液	
流速	0.8 mL/min	
梯度程序	时间 (min)	% B
	0.0	15
	2.0	70
	2.1	95
	5.5	95
	5.51	15

停止时间	5.6 min
后运行时间	2 min
最大泵压	400 bar
进样体积	10 μ L
带针头清洗的进样	
针头清洗	用甲醇-水 (95 : 5) 冲洗针座 10 s
禁止重叠进样模式	
无自动减小延迟体积	

MS 条件

ES 离子源参数

离子化模式	正离子
毛细管电压	2800 V
干燥气流量	10 L/min
干燥气温度	350 $^{\circ}$ C
雾化气压力	35 psi
鞘气流量	12 L/min
鞘气温度	350 $^{\circ}$ C
喷嘴电压	0 V

MS 参数

扫描方式	MRM
预运行程序	SCP_MS DiverterValveToWaste() {MH_Acq_Scripts.exe}
时间段	#1: 1.8 min - 转换阀至 MS
EMV (+) 增益	400 V

表 1 展示了目标化合物及其同位素内标物 MRM transitions 的定量离子和定性离子。

表 1. MRM transitions

化合物名称	母离子	MS1 的分辨率	子离子	MS2 的分辨率	碎裂电压	碰撞能量
丁丙诺啡	468.3	Unit	55.1	Wide	200	62
丁丙诺啡	468.3	Unit	396.2	Wide	200	45
丁丙诺啡-D ₄	472.3	Unit	59.1	Wide	200	62
丁丙诺啡-D ₄	472.3	Unit	400.2	Wide	200	45
去甲丁丙诺啡	414.3	Unit	83.1	Wide	188	60
去甲丁丙诺啡	414.3	Unit	57.1	Wide	188	50
去甲丁丙诺啡-D ₃	417.3	Unit	83.1	Wide	188	60
去甲丁丙诺啡-D ₃	417.3	Unit	57.1	Wide	188	50

结果与讨论

在低 pH 值条件下，丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的叔胺官能团被质子化，通过疏水作用和强阳离子交换作用，它们在 Agilent Bond Elut Plexa PCX 聚合物吸附剂上获得较强的保留。

使用 100% 甲醇淋洗会从 SPE 柱上冲下部分分析物而造成损失。有效去除基质干扰物而又不损失样品的最佳淋洗条件为甲醇-2% 甲酸溶液 (70 : 30)。在有机洗脱液中加入强碱以破坏分析物和强阳离子交换吸附剂之间的离子相互作用。在样品洗脱开始前添加 5% 氨水到乙酸乙酯: 异丙醇混合洗脱液 (80 : 20) 中，丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡可以得到最佳的回收率。推荐使用两步洗脱法并结合浸泡步骤，以增强溶剂-分析物的相互作用并提高样品回收率。

由于疏水性强，丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡可能粘附到玻璃器皿、LC 管路和进样器部件中，这也是为什么我们推荐在 LC 方法中使用 95% 甲醇冲洗色谱柱和使用甲醇-水 (95 : 5) 冲洗针座的原因。采用去活处理的样品瓶/内插管和甲醇清洗并晾干的玻璃器皿 (STD 和 ISTD 稀释液用的管和瓶子) 也确保了结果的良好重现性。

LC 分离开始时特意以相对较低比例的有机相 (15%) 进行洗脱，以使血样中的盐和其它极性化合物在样品运行初期即被洗脱下来。0.8 mL/min 的流速使分析时间和再平衡时间都较短。每次样品运行均将开始部分的洗脱液 (0 到 1.8 min) 导入废液中，以最大程度地降低对离子源的污染。1.8 min 时开始数据采集，即转换阀切换后立即开始。

图 2 为丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡在 0.2 ng/mL LOQ 时及其氘代内标物在 10 ng/mL 时的色谱图。

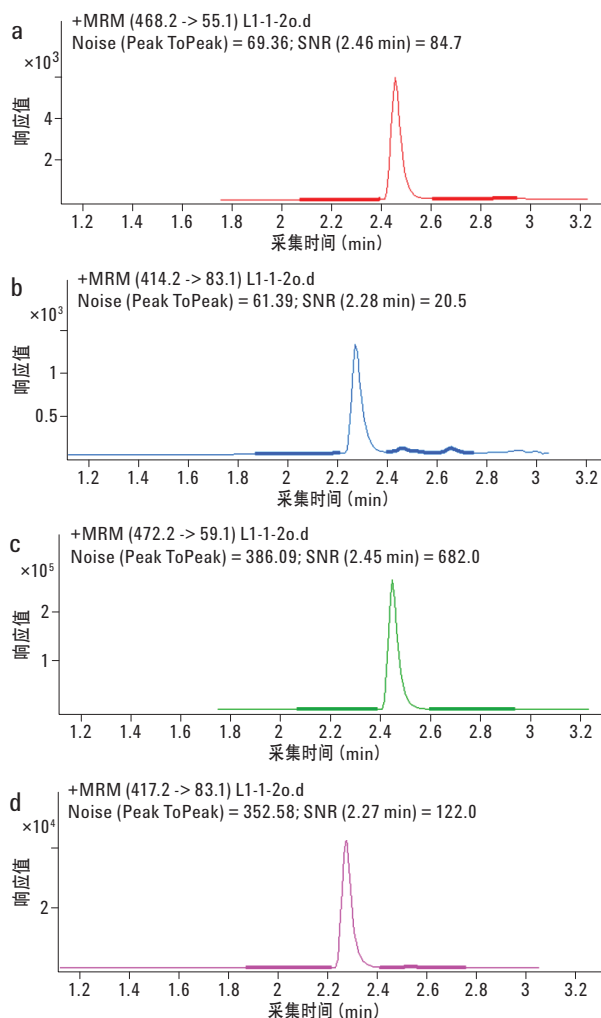


图 2. MRM 萃取离子色谱图: a - 丁丙诺啡, b - 去甲丁丙诺啡 (均为 0.2 ng/mL), c - 丁丙诺啡-D₄, d - 去甲丁丙诺啡-D₃ (均为 10 ng/mL)。全血提取物经 Agilent Bond Elut Plexa PCX 处理, 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 3 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱分析。噪音区域加粗显示

丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡这两种化合物分子离子的高稳定性给 MS/MS 检测造成了困难，这导致许多研究人员采用 SIM 模式对它们进行定量 (Scislowski et al, 2005; Concheiro et al, 2009)，或者在 SRM 模式下采用较高的碰撞能量 (无碎片) 监测分子离子的转换离子 (Kronstrand et al, 2003; Selden et al, 2011)。与选择性更强的母离子-子离子对定量相比，这种方法可靠性差。并且，这种方法有较低的信噪比，从而具有较高的 LLOQ。利用 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 系统 (表 1) 在高碰撞能量水平下获得了一种新的稳定碎片类型，两种分析物在 LLOQ 为 0.2 ng/mL 时均可实现可靠定量。丁丙诺啡丰度最高的碎片是 m/z 55.1 的甲基环丙基 (C_4H_7) 基团。它通过丁丙诺啡- D_4 的 m/z 59.1 碎片得以鉴定确认。去甲丁丙诺啡丰度最高的碎片离子 (m/z 83.1) 可能来自母离子的侧支链，包括叔丁基基团 ($CH_3)_3C$ 。与最佳碰撞能量下获得的最常用碎片离子相比，丁丙诺啡的 m/z 55.1 子离子的丰度比 m/z 396.2 高 8 倍，而去甲丁丙诺啡 m/z 83.1 子离子的丰度比 m/z 101.1 高 2 倍。

表 1 中列出的 MRM transitions 是两种目标化合物及其氘代 ISTD 的一个定量和一个定性离子。Agilent MassHunter 软件自动计算定性离子的比率，突出显示那些超出可接受范围的离子。

常态或动态 MRM 采集模式在这种方法下均可使用。

LLOQ 水平为 0.2 ng/mL 时的信噪比分别为丁丙诺啡 84 : 1，去甲丁丙诺啡 20 : 1 (图 2, a 和 b)。这证明了本样品净化程序的高效性和 6460 三重四极杆质谱出色的检测灵敏度，从而能够实现低于 0.1 ng/mL 的 LOD 下检测这些分析物。

图 3 展示了 5 种浓度全血标样中提取的丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的典型的校正曲线。校正标样由加标分析物至全血中制得，使浓度分别为 0.2、1、5、10 和 20 ng/mL。添加氘代内标物的浓度为 10 ng/mL。每条曲线出色的线性拟合 ($R^2 > 0.999$) 证明了本方法线性良好。未采用加权处理，曲线拟合中包括了起点数据。

表 2 展示了五个全血样品的回收率 (准确度) 和精密度 (CV, 或 RSD) 数据，其每个分析物的加标浓度均为 1 ng/mL。通过对比加标混合标样获得的校正曲线进行定量分析 (图 3)。

表 2. 每个分析物在浓度为 1 ng/mL 时进行的方法验证, $n = 5$

	准确度 (%)	CV %
丁丙诺啡	94.2	0.6
去甲丁丙诺啡	103	0.2

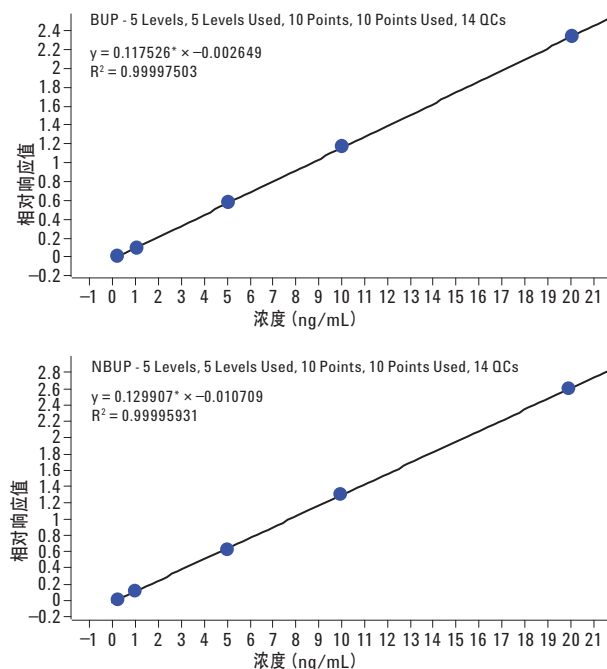


图 3. 全血提取物中丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的典型校正曲线。浓度范围 0.2 至 20 ng/mL。线性拟合 $R^2 > 0.999$

结论

本文介绍了一种简单的、固相萃取结合 LC/MS/MS 检测的方法，实现了全血中浓度低于 0.2 ng/mL 的丁丙诺啡和去甲丁丙诺啡的定量分析。本方法专为安捷伦 1100 和 1200 LC 系列仪器的用户开发，因为其 LC 系统的背压不能超过 400 bar。如采用其它型号的安捷伦三重四极杆 LC/MS 系统仪器运行本方法，离子源参数可以很容易修改。由于样品提取物的净化度高，同时使用经高丰度碎片离子重新鉴定的离子转换通道的耐用的 MS 检测，使本方法获得了较低检测限。

参考文献

Baselt, R. (2008) Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 8th edition. Atlas Books, Ashland, OH, USA.

Concheiro, M., Shakleya, D. M. and Huestis, M. A. (2009) Simultaneous quantification of buprenorphine, norbuprenorphine, buprenorphine-glucuronide and norbuprenorphine-glucuronide in human umbilical cord by liquid chromatography-tandem mass spectrometry *Forensic Science International*, 188 (1-3): 144–151.

Kronstrand, R., Selden, T. G. and Josefsson, M. (2003) Analysis of buprenorphine, norbuprenorphine, and their glucuronides in urine by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 27: 464–470.

Miller, E. I., Torrance, H. J. and Oliver, J. S. (2006) Validation of the Immunalysis microplate ELISA for the detection of buprenorphine and its metabolite norbuprenorphine in urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 30:115–119.

Moody, D. E., Slawson, M. H., Strain, E. C., Laycock, J. D., Spanbauer, A. C. and Foltz, R. L. (2002) A liquid chromatographic–electrospray ionization-tandem mass spectrometric method for determination of buprenorphine, its metabolite, norbuprenorphine, and a coformulant, naloxone, that is suitable for in vivo and in vitro metabolism studies. *Analytical Biochemistry*, 306: 31–39.

Moore, C., Coulter, C. and Crompton, K. (2007) 液相色谱/三重四极杆质谱测定尿样中的丁丙诺啡、去甲丁丙诺啡及其葡萄糖苷酸产物。安捷伦应用报告 5989-7072CHCN。安捷伦科技有限公司。

Øiestad, E. L., Johansen, U., Øiestad, A. M. L. and Christophersen, A. S. (2011) Drug screening of whole blood by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 35: 280-293.

Scislowski, M., Piekoszewski, W., Kamenczak, A. and Florek, E. (2005) Simultaneous determination of buprenorphine and norbuprenorphine in serum by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 29: 249–253.

Selden, T., Roman, M., Druid, H. and Kronstrand, R. (2011) LC–MS–MS analysis of buprenorphine and norbuprenorphine in whole blood from suspected drug users. *Forensic Science International*, 209: 113–119.

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们网站：www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012年2月28日，中国印刷
5990-9930CHCN