

SPE-GC-MS 法检测尿液中丁丙诺啡及去环丙甲基丁丙诺啡*

Determination of Buprenorphine and Norbuprenorphine in Urine by SPE-GC-MS

黄克建¹, 李宏森¹, 朱定姪², 林翠梧³, 李璐¹, 刘晓锋¹

HUANG Ke-jian¹, LI Hong-sen¹, ZHU Ding-ji², LIN Cui-wu³, LI Lu¹, LIU Xiao-feng¹

(1. 广西壮族自治区公安厅物证鉴定中心, 广西南宁 530012; 2. 广西职业病防治研究院, 广西南宁 530021; 3. 广西大学化学化工学院, 广西南宁 530004)

(1. Institution of Forensic Science, Public Security Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi, 530012, China; 2. Guangxi Institute of Occupational Disease Prevention and Treatment, Nanning, Guangxi, 530021, China; 3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要: 建立以氘代化合物为内标测定尿液中丁丙诺啡及去环丙甲基丁丙诺啡的 GC-MS 分析方法。尿液经 β -葡萄糖醛酸酶水解后, 加入 d_4 -丁丙诺啡和 d_3 -去环丙甲基丁丙诺啡氘代同位素内标物, 固相萃取, 经硅烷化试剂衍生化后, 进行 GC-MS-SIM 模式分析。结果显示, 在 0.05~4.0 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内丁丙诺啡及去环丙甲基丁丙诺啡都呈现良好线性关系, 相关系数分别为 0.9997、0.9998, 检出限分别为 0.0017 $\mu\text{g/ml}$ 、0.0085 $\mu\text{g/ml}$; 空白样品加标平均回收率 >86%, *RSD* 分别为 1.5%、2.3%。该方法简单、可靠、重复性好, 可以应用于丁丙诺啡滥用者的尿液检测。

关键词: 气相色谱-质谱联用法 固相萃取 丁丙诺啡 去环丙甲基丁丙诺啡 氘代内标 衍生化

中图分类号: O657.67 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2010)03-0258-03

Abstract: Buprenorphine and norbuprenorphine in urine were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry using deuterated as internal standard. After the β -glucuronidase hydrolysis, d_3 -norbuprenorphine and d_4 -buprenorphine were added into the urine samples. Then they were extracted by solid-phase extraction. The N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide was added to the extracts to derivative buprenorphine, norbuprenorphine and the internal standards. The derivated analytes were determined by gas chromatography-mass SIM mode. This method showed a high linearity from 0.05 $\mu\text{g/ml}$ to 4.0 $\mu\text{g/ml}$ with correlation coefficients being 0.9997 and 0.9998. The limits of detection were 0.0017 $\mu\text{g/ml}$ and 0.0085 $\mu\text{g/ml}$ for the buprenorphine and norbuprenorphine. And the recoveries of buprenorphine and norbuprenorphine were more than 86% and the relative standard deviations (*RSD*) were 1.5% and 2.3%. This method is simple, reliable, reproducible, and can be applied to the detection of buprenorphine in the urine.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry, solid phase extraction, buprenorphine, norbuprenorphine, deuterated internal standard, derivatization

收稿日期: 2010-04-02

作者简介: 黄克建(1969-), 男, 高级工程师, 主要从事理化检验鉴定工作。

* 公安部应用创新计划项目(2007YYCXGXST081); 广西壮族自治区公安厅科学研究与技术开发计划项目(桂公[科技][2005]4号)资助。

丁丙诺啡(Buprenorphine, BUP)又叫布诺啡、叔丁啡, 系半合成的东罂粟碱类衍生物, 为阿片受体激动-拮抗剂, 是一种强力的止痛剂, 镇痛效果比吗啡强 25~50 倍, 临床上用于各种术后止痛, 癌性痛、烧伤、肢体痛等, 还可以用来治疗海洛因依赖和其它阿片类药物依赖症^[1~3]。近年来, 我国云南、广东、广

西、湖南等省吸毒人群滥用了丁丙诺啡现象有蔓延趋势,成瘾者日渐增多^[4,5],因此丁丙诺啡已成为公安理化检验鉴定中常见的药物之一。在人体内,丁丙诺啡经过细胞色素 P450 3A4 酶代谢,在 N 位上脱烷基生成去环丙甲基丁丙诺啡(norbuprenorphine, norBUP)代谢物^[6]。丁丙诺啡检测的方法有 GC、GC-MS、HPLC、LC/MS 法^[7~13],国内仅见有丁丙诺啡的检测研究,还未见有去环丙甲基丁丙诺啡检测报道。本文采用固相萃取技术(SPE)和硅烷衍生化的方法,结合 GC-MS 技术对尿液中的丁丙诺啡及去环丙甲基丁丙诺啡进行定性定量分析研究,建立的方法可以应用于丁丙诺啡滥用者尿液的检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

QP2010 气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司生产),配电子电离轰击源(EI),GCMS solution 色谱工作站;3-18R 高速冷冻离心机(美国 TOMOS 公司生产);固相萃取仪(美国 SUPELCO 公司生产);Oasis[®] HLB3cc 固相萃取柱(美国 Waters 公司生产);WD900CSL23-2 微波炉(广东格兰仕生产);TTL-DC 型氮吹仪(北京同泰科技发展有限公司生产)。

盐酸丁丙诺啡(中国药品生物制品检定所提供),去环丙甲基丁丙诺啡、d₄-丁丙诺啡(内标)和 d₃-去环丙甲基丁丙诺啡(内标)(美国 Sigma 公司出品,1mg/ml 甲醇储备液)(结构见图 1);N,O-双三甲基硅烷基三氟乙酰胺(99%BSTFA+1%TMCS)硅烷化试剂(美国 Sigma 公司出品);β-葡萄糖醛酸酶(美国 Sigma 公司出品,批号:093K8600,22mg,1134600U/g),临用时用 pH 值 4.7 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液配制成 5000 U/ml。

甲醇、乙酸乙酯、Tris 试剂(三羟甲基氨基甲烷试剂)等试剂均为国产分析纯。丁丙诺啡标准储备液(1.0mg/ml):称取 10.8mg 盐酸丁丙诺啡于 10ml 容量瓶中,用甲醇溶解至刻度,摇匀,备用。

丁丙诺啡和去环丙甲基丁丙诺啡混合标准工作液(5.0 μg/ml):分别吸取丁丙诺啡和去环丙甲基丁丙诺啡储备液各 50 μl 于 10 ml 容量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,备用。d₄-丁丙诺啡和 d₃-去环丙甲基丁丙诺啡混合内标液(5.0 μg/ml)的制取同样。

1.2 色谱-质谱条件

气相色谱条件:色谱柱:J&W DB-5MS 石英毛细柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);柱温 180℃,保

持 1 min,以 15℃/min 程序升温升至 280℃,保持 18 min;进样口温度 280℃;载气(He)流速 1.40ml/min;不分流进样。

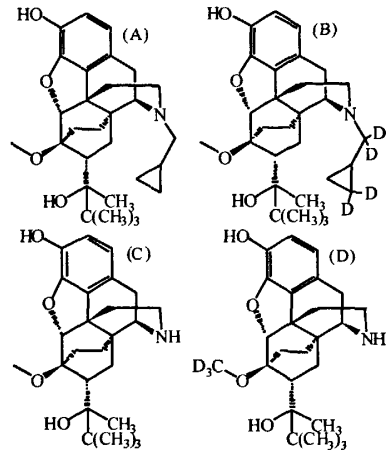


图 1 丁丙诺啡(A)、去环丙甲基丁丙诺啡(B)、d₄-丁丙诺啡(C)、d₃-去环丙甲基丁丙诺啡(D)结构

质谱条件:电子轰击电离源;电子能量 70 eV;倍增器电压 1.0 kV;传输线温度 250℃;离子源温度 200℃;采集方式:选择离子监测扫描模式(SIM)。各化合物的保留时间及定性定量离子见表 1。

表 1 化合物的保留时间和定性定量离子

化合物	采集时间 (min)	保留时间 (min)	定性离子 (m/z)	定量离子 (m/z)
d ₃ -norBUP-TMS	15.0~19.0	16.38	413,431,455	431
norBUP-TMS	15.0~19.0	16.45	410,428,452	428
d ₄ -BUP-TMS	19.0~23.0	21.17	454,486,510	454
BUP-TMS	19.0~23.0	21.28	450,482,506	450

1.3 试验方法

取尿样 1ml 于 10ml 玻璃试管中,加入 pH 值 4.7 乙酸-乙酸钠缓冲溶液 0.5ml、β-葡萄糖醛酸酶溶液 50μl,57℃下酶解 1.5h,冷却至室温,加入混合内标液 0.2ml,pH 值 9.2 的缓冲液 3 ml,涡旋 1 min,离心(7000 r/min)10 min,上清液过 Oasis[®] HLB 3cc 固相萃取小柱(预先用甲醇 3 ml、超纯水 3 ml,pH 值 9.2 的 Tris-HCl 缓冲液 3 ml 活化),用 5% 甲醇水溶液 3 ml 淋洗杂质,弃去,离心(7000 r/min)5min,用 3ml 氯仿洗脱,80℃氮气吹干,在氮气保护下分别加入 50μl 乙酸乙酯、硅烷化试剂,涡旋振荡 1min,微波衍生 6min,供 GC-MS 分析。

2 结果与分析

2.1 试验条件优化

2.1.1 色谱条件优化

丁丙诺啡及其代谢物去环丙甲基丁丙诺啡分子

量比较大,沸点较高,且分子结构中存在极性较大的羟基基团,不容易汽化,气相色谱特性不好。通过硅烷衍生化可以改善目标化合物的挥发性,改变化合物色谱性能,提高检测灵敏度。按照试验方法对加标 $1.0\mu\text{g}$ 的空白尿液进行分析,色谱图见图 2。从图 2 可见,各药物色谱峰峰形对称。

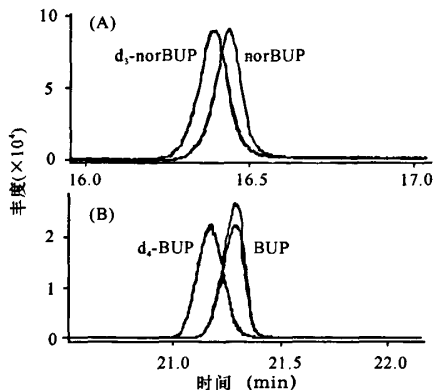


图 2 4 种物质的硅烷衍生物色谱

(A) d_3 -norBup-TMS $m/z = 413, 431, 455$, norBup-TMS $m/z = 410, 428, 452$; (B) d_4 -Bup-TMS $m/z = 454, 486, 510$, Bup-TMS $m/z = 450, 482, 506$.

2.1.2 内标物选择

选择丁丙诺啡、去环丙甲基丁丙诺啡相应的氘代化合物作为内标物,其物理化学性质、色谱行为和响应特征与被分析目标化合物基本相似,确保了分析检测的准确性。

2.1.3 衍生化时间的考察

分别吸取 0.2 ml 混合标准工作液、混合内标液于尖底试管中, 80°C 下用氮气吹干溶剂,分别加入 $50\mu\text{l}$ 衍生化试剂和乙酸乙酯后,考察 1min、2min、3min、4min、5min、6min、7min 的微波衍生(最小档)效率。结果药物峰面积随着时间的延长逐渐增大,6min 后药物峰面积增加不显著。试验选取衍生化时间为 6min。

2.1.4 洗脱溶剂的选择

分别选用乙醚、二氯甲烷、三氯甲烷、氯仿-异丙醇(9+1)等 4 种溶剂作为洗脱溶剂,按照试验方法操作步骤,对加标 $1.0\mu\text{g}$ 的空白尿液进行洗脱。结果发现氯仿-氯仿-异丙醇(9+1)洗脱效果较好,但是用氯仿溶剂洗脱得到的洗脱液比较干净,因此试验选择氯仿为洗脱溶剂。

2.1.5 溶液酸度的选择

吸取加标 $1.0\mu\text{g}$ 的空白尿液,分别将溶液 pH 值调节为 4.7、7.0、9.2,按照试验方法考察提取回收率。结果发现,溶液在 pH 值 9.2 的提取回收率最

高。试验选择将溶液 pH 值调节至 9.2 后进行分析。

2.2 方法评价

取空白尿液分别配制混合标准溶液($\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.05、0.1、0.2、0.8、2.0、4.0,按照试验方法进行分析,以分析物与相应内标衍生物的定量离子峰面积比值为纵坐标,分析物浓度为横坐标作线性回归,得到内标标准工作曲线,结果丁丙诺啡和去环丙甲基丁丙诺啡呈良好的线性关系,丁丙诺啡线性方程为 $y = 1.2587x - 0.0203$,相关系数为 0.9997;去环丙甲基丁丙诺啡线性方程为 $y = 1.0625x + 0.0059$,相关系数为 0.9998。

以空白尿液加标, $S/N = 3$ 所对应的丁丙诺啡、去环丙甲基丁丙诺啡的浓度求得方法检出限分别为 $0.0017\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.0085\mu\text{g}/\text{ml}$ 。空白尿液进行添加回收实验,结果见表 2。

表 2 回收率及精密度($n=5$)

化合物	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	测定浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	平均回收率 (%)	RSD (%)
丁丙诺啡	0.50	0.43	86.5	1.5
去环丙甲基丁丙诺啡	0.50	0.50	100	2.3

2.3 样品分析

用上述试验方法检测 4 例丁丙诺啡阳性尿液,结果丁丙诺啡含量为 $0.06\sim 0.12\mu\text{g}/\text{ml}$,去环丙甲基丁丙诺啡含量 $0.15\sim 0.38\mu\text{g}/\text{ml}$ 。本方法对样品的分析结果比较理想。

3 结束语

本文采用固相萃取(SPE)和硅烷衍生化方法,并结合 GC-MS 技术对尿液中的丁丙诺啡及去环丙甲基丁丙诺啡进行检测。该方法简单,可靠,实用性强,对样品的分析结果较理想,可以应用于丁丙诺啡滥用者尿液的检测。

参考文献:

- [1] 严美新. 丁丙诺啡复合局麻药用于臂丛神经阻滞的临床观察[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28(17): 2074.
- [2] 杜心涛, 阮奕满, 卢成内. 丁丙诺啡舌下片在家庭戒毒中疗效观察[J]. 中国临床医学研究杂志, 2007, 17(2): 17-18.
- [3] Walsh S L, Preston K L, Bigelow G E, et al. Acute administration of buprenorphine in humans: partial agonist and blockade effects[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1995, 274(1): 361-372.
- [4] 张登科, 周旭辉, 张雪辉, 等. 丁丙诺啡舌下片合并东莨菪碱、异丙嗪静脉注射对认知功能的影响[J]. 中国药物依赖性杂志, 2006, 15(1): 53-56.

(下转第 263 页)

说明方法的精密度良好,灵敏度高。

表2 各挥发性有机物的回收率、相对标准偏差及检出限

化合物	回收率 (%)	RSD (%)	检出限 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
苯	92	3.16	0.05
甲苯	95	3.71	0.05
乙苯	89	4.39	0.1
乙酸正丁酯	86	4.45	0.2
对间二甲苯	97	3.66	0.05
苯乙烯	92	4.83	0.05
邻二甲苯	96	3.27	0.05
正十一烷	89	4.97	0.3

2.6 样品分析

应用本方法对真皮皮革、超纤皮、灰色无纺布、海棉、塑料脚垫、地毯脚垫6种车内装饰材料样品进行测试。表3结果表明,不同车内装饰材料中挥发性

表3 各种车内装饰材料样品测试结果

化合物	挥发性有机物含量(mg/m^3)					
	真皮皮革	超纤皮	无纺布	海棉	塑料脚垫	地毯脚垫
苯	0.051	0.094	未检出	0.019	0.122	0.022
甲苯	0.212	0.132	未检出	0.017	0.284	0.095
乙苯	0.025	0.016	未检出	未检出	0.066	0.141
乙酸正丁酯	未检出	0.058	未检出	未检出	0.163	0.074
对间二甲苯	0.027	0.013	未检出	未检出	0.024	0.037
苯乙烯	0.019	0.027	未检出	0.076	0.017	未检出
邻二甲苯	0.031	0.012	未检出	未检出	0.031	0.024
正十一烷	未检出	未检出	未检出	未检出	0.115	0.053

有机物含量各有不同,所以建立有效的挥发性有机物检测方法,对选择环保的车内装饰材料具有现实意义。

3 结束语

本文采用 GERSTEL 样品提取器提取出车内装饰材料中释放的挥发性有机物,用 Tenax-TA 管富集,然后用热脱附/冷阱捕集/气相色谱-质谱法进行测试,并分析不同车内装饰材料所释放挥发性有机物的含量。该方法方法检出限为 $0.05\sim 0.30\ \mu\text{g}/\text{m}^3$,回收率为 $86\%\sim 96\%$,相对标准偏差为 $3.16\%\sim 4.97\%$ 。该方法快速、简单、灵敏度高、检出限低,可以为车内装饰材料质量控制提供可靠的参考依据。

参考文献:

- [1] VDA278. Thermo desorption analysis of volatile organic compounds emissions for the characterization of non-metallic auto. mobile interior materials[S]. 2002-09.
- [2] VDA 277. Determination of emission of volatile organic compounds of non. metallic materials from vehicles interior[S]. 1995-01.

(责任编辑:韦廷宗)

(上接第260页)

- [5] 白丽琴,王继望,傅文,等. 云南省丁丙诺啡片与安定、盐酸异丙嗪等多种药物混合滥用的潜力分析[J]. 中国药物依赖性杂志,2009,18(3):215-219.
- [6] Kobayashi K, Yamamoto T, Chiba K, et al. Human buprenorphine N-dealkylation is catalyzed by cytochrome P450 3A4[J]. Drug Metab Dispos, 1998, 26(8):818-821.
- [7] Rodriguez-S ME, Lofwall MR, Strain EC, et al. Simultaneous determination of buprenorphine, norbuprenorphine and the enantiomers of methadone and its metabolite (EDDP) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 850(1-2):538-543.
- [8] Everhart E T, Cheung P, Shonek P, et al. Subnanogram-concentration measurement of buprenorphine in human plasma by electron-capture capillary gas chromatography: application to pharmacokinetics of sublingual buprenorphine[J]. Clin Chem, 1997, 43(12):2292-2302.
- [9] Fuller D C. A simple gas chromatography-mass spectrometry procedure for the simultaneous determination of buprenorphine and norbuprenorphine in human urine[J]. J Anal Toxicol, 2008, 32(8):626-630.
- [10] Kacinko S L, Concheiro-Guisan M, Shakleya D M, et al. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of buprenorphine, norbuprenorphine, and metabolites in human urine[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 392(5):903-911.
- [11] 黄克建,李宏森,吕美忠,等. 气相色谱-质谱联用法快速测定尿液中丁丙诺啡[J]. 理化检验, 2010, 46(2):200-201.
- [12] 刘冬娴,贺江南,徐连生. 固相萃取 GC/NPD 检测人血浆中丁丙诺啡[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(8):1323-1325.
- [13] 刘冬娴. 尿液中丁丙诺啡的液相色谱-质谱分析[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2008, 34(4):485-489.

(责任编辑:尹 闯)