

人血浆中双氢可待因浓度 HPLC-MS/MS 测定方法的建立

赵 亮, 童 建, 李建祥, 陶继来

(苏州大学医学部公共卫生学院, 江苏 苏州, 215123)

摘 要: 目的 建立测定人血浆中双氢可待因浓度的高效液相色谱-串联质谱分析方法。方法 血浆样品用甲醇沉淀蛋白后, 选用安捷伦色谱柱 XDB-C18, 2.1 × 50 mm, 5 μm 梯度洗脱。流动相 A 为 0.1% 甲酸 10 mM 甲酸铵水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸甲醇。流动性梯度为 0 min (B 5%) → 1 min (B 5%) → 1.3 (B 65%) → 2.4 min (B 65%) → 2.5 min (B 5%) → 3.5 min (B 5%)。流速 0.6 mL/min, 柱温 30 °C, 自动进样器温度 4 °C, 进样量 10 μL。选用岛津 LC-20A 高效液相色谱系统和串联 API4000 Qtrap 型三重四极杆质谱仪, ESI 源正离子 MRM 扫描, IS 电压 5500 V, CAD 气 Medium, CUR 气 40 psi, Gas1: 35 psi, Gas2: 40 psi, 源温度 550 °C, EP 电压 10 V, CXP 电压 9 V。双氢可待因: m/z 302.1 → 199.1, DP 电压: 105 V, CE 电压: 47 V。右美沙芬(内标): m/z 271.3 → 170.1, DP 电压 100 V, CE 电压 54 V。结果 该方法测定血浆中双氢可待因的线性范围为 2 ~ 1 000 ng/mL ($r > 0.99$), 定量下限为 2 ng/mL, 准确度均在 85% ~ 115%, 批内和批间精密性也均 < 15%。稳定性试验中, 血浆样品及血浆经处理后样品中的双氢可待因在方法学要求的各种贮存条件下均比较稳定。结论 该方法简单、快速、灵敏、专属性强、重现性好, 适用于检测人血浆中双氢可待因浓度的研究。

关键词: 双氢可待因; 质谱; LC-MS/MS

中图分类号: R 96 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2013)21-004-04 DOI: 10.7619/jcmp.201321002

Determination of dihydrocodeine in human plasma by HPLC-MS/MS

ZHAO Liang, TONG Jian, LI Jianxiang, TAO Jilai

(The Medical College of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, 215123)

ABSTRACT: **Objective** To establish the HPLC-MS/MS method for determination of dihydrocodeine in human plasma. **Methods** After protein precipitation with methanol, the analyte and internal standard were separated on a agilent XDB-C18, 2.1 × 50 mm, 5 μm analytical column using the gradient elution method at a flow rate of 0.6 mL/min. The mobile phase A was 0.1% formic acid and 10 mM ammonium formate in water, and the mobile phase B was 0.1% formic acid in methanol. The ratio of mobile phase B was 0 min (5%) → 1 min (5%) → 1.3 (65%) → 2.4 min (65%) → 2.5 min (5%) → 3.5 min (5%). Column temperature: 30 °C, the autosampler temperature: 4 °C, injection volume: 10 μL. Detection was carried out by SHIMADZU LC-20A liquid chromatography and electrospray positive ionization mass spectrometry in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. IS voltage: 5 500 V, CAD gas: Medium, CUR gas: 40 psi, Gas1: 35 psi, Gas2: 40 psi, source temperature: 550 °C, EP voltage: 10 V the CXP voltage: 9 V. Dihydrocodeine: m/z 302.1 → 199.1, DP voltage: 105 V, CE voltage: 47 V. Dextromethorphan (internal standard): m/z 271.3 → 170.1 DP voltage: 100 V, CE voltage: 54 V. **Results** The calibration curve is linear over the concentration range of 2 - 1000 ng/mL with the lower limit of quantitation (LLOQ) 2 ng/mL. The Accuracy is in the range of 85 - 115%, inter- and intra-day precisions are both less than 15%. In the stability studies, dihydrocodeine in the plasma and the prepared plasma samples was found to be stable under various storage conditions. **Conclusion** The established HPLC-MS/MS method is simple, rapid, sensitive, specific and reliable for the determination of dihydrocodeine in human plasma.

KEY WORDS: dihydrocodeine; mass spectrometry; LC-MS/MS

收稿日期: 2013-05-23

通信作者: 童建, 教授, E-mail: tongjian@suda.edu.cn

双氢可待因是半合成的阿片类药物,常用于术后镇痛和缓解咳嗽、发热症状^[1-2]。双氢可待因结构上类似于可待因,在人体内可经去甲基后转化为双氢吗啡,且较可待因具有更强的镇痛作用,不易成瘾^[3]。然而双氢可待因属于毒品类药物,国内外对其检测也多种多样,但很多方法都存在一定的局限性,如复杂的样品处理过程,灵敏度不够^[4-5]。该实验利用简单的蛋白沉淀法对双氢可待因血浆样品进行处理并建立有效可靠的 LC-MS/MS 分析方法,不仅提高了检测人血浆中双氢可待因的定量下限,而且简化了样品的处理方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

质谱仪为美国 AB SCIEX 公司的 API4000 Qtrap 型三重四极杆串联质谱,配有电喷雾离子化源(ESI)和 Analyst 1.5.1 数据处理软件。液相色谱仪为日本岛津 LC-20A 型高效液相色谱系统,包括在线脱气机(DGU-20A3)、二元输液泵(LC-20AD)、自动进样器(SIL-20AC)、柱温箱(CTO-20AC)。色谱柱为美国安捷伦 XDB-C18, 2.1 × 50 mm, 5 μm。保护柱为广州菲罗门 C18, 4 × 30 mm。电子天平为 MS105DU, 梅特勒·托利多上海仪器公司,灵敏度 0.01 mg。高速冷冻离心机为 K2015R 型,美国 Centurion Scientific 公司。

1.2 试剂

酒石酸双氢可待因对照品购自中国药品生物制品检定所,批号:171252-200401。右美沙芬(内标)购自 Sigma,纯度 > 98%,批号:090 M 1298V。甲醇为 Fisher Scientific 公司 HPLC 级,批号:122044。甲酸为 DIKMA TECHNOLOGIES 公司 HPLC 级,批号:1496682。

1.3 溶液配制

储备液、标曲样品及质控样品:精密称取酒石酸双氢可待因约 15 mg,用 50% 甲醇水溶解后定容至 10 mL 作为储备液,储备液浓度(mg/mL) = 301.4/451.5 × 重量/10。用 50% 甲醇水将双氢可待因储备液稀释至浓度为 100 μg/mL 的工作液,然后用人肝素抗凝血浆将工作液稀释至浓度为 1 000、500、200、100、50、10、5、2 ng/mL 的标曲样品和 800、80、5 ng/mL 的质控样品。内标溶液:称取右美沙芬约 10 mg,用甲醇溶解并配制成浓度为 1 mg/mL 的右美沙芬储备液。用甲醇将右美沙芬内标储备液稀释至浓度为 20 ng/mL 的内

标溶液。

1.4 血浆样品处理方法

取血浆样品 30 μL 置于 1.5 mL EP 管中,加入 90 μL 内标溶液,涡旋混合约 30 s,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 50 μL 加入纯水 200 μL,涡旋混匀后进样分析。

1.5 色谱及质谱条件

色谱条件:流动相 A 为 0.1% 甲酸 10 mM 甲酸铵水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸甲醇。流动性梯度为 0 min (B 5%) → 1 min (B 5%) → 1.3 (B 65%) → 2.4 min (B 65%) → 2.5 min (B 5%) → 3.5 min (B 5%)。流速 0.6 mL/min,柱温 30 °C,自动进样器温度 4 °C,进样量 10 μL。

质谱条件:ESI 源正离子 MRM 扫描,IS 电压 5 500 V, CAD 气 Medium, CUR 气 40 psi, Gas1: 35 psi, Gas2: 40 psi, 源温度 550 °C, EP 电压 10 V, CXP 电压 9 V。双氢可待因: m/z 302.1 → 199.1, DP 电压 105 V, CE 电压 47 V。右美沙芬(内标): m/z 271.3 → 170.1, DP 电压 100 V, CE 电压 54 V。

2 结果

2.1 二级质谱图

用 50% 甲醇水分别将双氢可待因储备液稀释至 100 ng/mL,扫描其二级质谱图,见图 1。

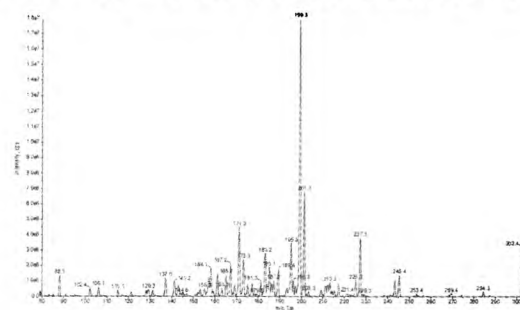


图1 双氢可待因的二级质谱图

2.2 特异性

分别取 6 个不同人的空白血浆 30 μL,以甲醇代替内标溶液按 1.4 所述血浆样品处理方法处理后进样分析,获得空白样品的色谱图。与定量下限样品(2 ng/mL)色谱图进行比较。结果表明空白血浆中的内源性物质不干扰双氢可待因和右美沙芬的测定。

2.3 系统残留

运行标曲上限(1 000 ng/mL)样品后,运行 1 个空白样品,考察 3 次。与定量下限样品色谱图

进行比较。结果表明系统残留的双氢可待因和右美沙芬不干扰双氢可待因和右美沙芬的测定。

2.4 标准曲线及定量下限

批标曲样品经1.4中所述血浆样品处理方法处理后进样分析,以内标法进行线性拟合求得回归方程的相关系数 r 在0.9961~0.9994,标曲中各点的准确度均在 $\pm 15\%$ 以内。在1个分析批内考察6个定量下限样品,6个定量下限样品的准确度在99.5%~113.8%,精密密度为6.4%。

2.5 准确度和精密密度

以一条标准曲线、3个质控浓度,每个质控浓度各6份样品,组成一个分析批,运行3个分析批考察准确度和精密密度。准确度均在85%~115%,批内和批间精密密度均 $<15\%$ 。见表1。

表1 HPLC-MS/MS法测定人血浆中双氢可待因的

准确度和精密密度($\bar{x} \pm s$) %			
浓度/(ng/mL)	准确度	批内精密密度	批间精密密度
5	96.7~114.3	2.4~10.8	8.5
80	92.6~110.5	2.8~6.9	4.9
800	85.8~101.2	2.1~5.7	8.5

2.6 提取回收率及基质效应

3个浓度质控样品进样分析得双氢可待因峰面积为PA1($n=6$);按血浆样品处理方法处理6个不同人的空白血浆,以处理后的上清液作为稀释液,用该稀释液将储备液稀释至0.25、4、40 ng/mL,进样分析得双氢可待因峰面积为PA2($n=6$);用50%(v/v)甲醇水溶液将储备液分别稀释至5、80、800 ng/mL,按血浆样品处理方法处理后,进样分析得双氢可待因峰面积为PA3($n=6$)。提取回收率=PA1/Average PA2 $\times 100\%$,基质效应=PA2/Average PA3 $\times 100\%$ ^[6]。结果显示,不同浓度样品有较高的提取回收率(95.2%~110.5%)和较好的基质效应(88.3%~99.3%)。见表2。

表2 HPLC-MS/MS法测定人血浆中双氢可待因的提取回收率和基质效应 %

浓度/(ng/mL)	提取回收率	基质效应
5	106.2~110.5	88.3~92.3
80	100.6~105.2	90.3~96.1
800	95.2~99.4	94.0~99.2

2.7 稀释回收率

用空白人血浆配制2 000 ng/mL的样品,再用空白人血浆分别将2 000 ng/mL的样品稀释10

倍和100倍($n=6$),按血浆样品处理方法处理后进样分析考察稀释回收率且稀释回收率均满足生物分析方法的要求(95.9%~106.1%)。见表3。

表3 HPLC-MS/MS法测定人血浆中双氢可待因的

稀释回收率		
浓度/(ng/mL)	稀释回收率/%	稀释倍数
200	95.9~101.3	10
20	97.1~106.1	100

2.8 稳定性

分别考察血浆样品在室温4 h、-20℃放置14 d、反复冻融3次(每次冷冻超过12 h)以及经血浆样品处理方法处理后的样品2℃~8℃放置24 h的稳定性,即配制低、高2个浓度的质控样品,分成若干份(每种考察条件每浓度各3个样品),在上述稳定性考察条件下放置或处理后,与即时(0 h)分析的样品进行比较。结果显示,血浆样品及血浆经处理后样品中的双氢可待因在各种贮存条件下均比较稳定。见表4。

表4 HPLC-MS/MS法测定人血浆中双氢可待因的

稳定性考察					
考察样品	条件	5 ng/mL		800 ng/mL	
		实测浓度/(ng/mL)	稳定性/%	实测浓度/(ng/mL)	稳定性/%
血浆样品	0 h	5.70	100.0	742.31	100.0
	室温4 h	5.29	92.9	712.06	95.9
	-20℃14 d	5.64	98.9	746.79	100.6
	反复冻融3次	5.40	94.7	748.51	100.8
处理后的样品2℃~8℃24 h		4.91	86.2	738.13	99.4

3 讨论

试验初期考虑参考以往文献^[7-9]中的液相方法,但双氢可待因极性较大,在C18反相色谱柱中保留较差,以往方法的有机相比比例较低,而低比例有机相很难将生物样品中复杂的基质洗脱干净。在高通量样品分析中容易造成基质残留色谱柱中或分析时间延长,故选择梯度洗脱液相方法。梯度洗脱方法对化合物的分离效果较好,通过调整梯度来减小基质效应,保证样品分析的准确性和精密性^[10-12]。该方法采用的梯度方法并未造成双氢可待因或内标较多的残留效应。

蛋白沉淀法虽然会增加样品中有机溶剂的比例,也会将化合物浓度稀释,但此方法非常适合处理一些极性较大的化合物,增加提取回收率,且其操作十分简便,避免了液液萃取过程中加入萃取液的误差,避免了样品复溶时产生的不溶物,也避免了吹干时的污染风险,缩短了样品处理的周

期^[13-14]。该方法中采用的蛋白沉淀法对双氢可待因的提取几乎未造成化合物在处理过程中的损失,较高的提取回收率也保证了样品分析的准确性和精密性。

2 ng/mL 的定量下限已满足对于双氢可待因的药动力学研究要求,为避免较多的稀释样品,该实验的样品处理方法中在蛋白沉淀后,对样品进行了5倍的稀释。若其他研究需要更低的定量限,可酌情降低稀释比例即可进一步降低定量下限。

目前国内外多采用高效液相色谱法来测定人血中双氢可待因的浓度,这些方法虽然也能检测血浆中的双氢可待因浓度,但存在诸如灵敏度低、成本高、操作复杂及分析周期长等缺陷^[15-16]。HPLC-MS/MS 法具有选择性好、灵敏度高、高通量等优点,目前已被广泛应用于检测生物样品中的药物以及药代动力学等研究^[17-21]。该研究建立了测定人血浆中双氢可待因的 HPLC-MS/MS 法,并进行了系统的方法确证。沉淀蛋白处理方法简单快速,避免了复杂的样品萃取处理过程,实现了高通量测定,通过优化后的色谱条件极大缩短检测时间,同时也减少了沉淀蛋白后生物样品中基质对双氢可待因的影响。该方法灵敏度高,血浆用量仅为 30 μ L,定量下限为 2 ng/mL,能够满足人体药代动力学研究的需要。

参考文献

- [1] 刘学勇,杨志渡,刘岩然. 路盖克片术后镇痛效果的临床研究[J]. 中国新药杂志, 1999, 8(3): 201.
- [2] COLLIER J, CHRISTRUP L, SOMOGYI A. Role of active metabolites in the use of opioids[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2009, 65(2): 121.
- [3] KLINDER K, SKOPP G, MATTERN R, et al. The detection of dihydrocodeine and its main metabolites in cases of fatal overdose[J]. Int J Legal Med, 1999, 112(3): 155.
- [4] WADA M, IKEDA R, KURODA N, et al. Analytical methods for abused drugs in hair and their applications[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(3): 1039.
- [5] BARROSO M, GALLARDO E, VIEIRA N, et al. Bioanalytical procedures and recent developments in the determination of opiates/opioids in human biological samples[J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(6): 1665.
- [6] 钟大放,李高,刘昌孝. 生物样品定量分析方法指导原则(草案)[J]. 药物评价研究, 2011, 34(6): 409.
- [7] 赵建波,陈慧敏,邱相君,等. HPLC-UV 法检测人血浆中双氢可待因的浓度[J]. 健康研究, 2010, 30(4): 248.
- [8] 刘丽京,邓艳萍,魏伟,等. 反相高效液相色谱法测定血浆中酒石酸双氢可待因/对乙酰氨基酚浓度的方法[J]. 中国临床药理学杂志, 2004, 20(3): 212.
- [9] 刘建春,栾成章,王立,等. 路盖克片中对乙酰氨基酚和酒石酸双氢可待因含量测定 HPLC 法的改进[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(8): 599.
- [10] 贾彦波,王清清,宋海峰. 高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MSn)分析生物样品时的基质效应研究[J]. 军事医学, 2011, 35(2): 149.
- [11] 曲斌,姜宝娜. 现代质谱法在药物代谢动力学研究中的应用[J]. 大连医科大学学报, 2005, 27(1): 68.
- [12] 齐美玲. 液相色谱-质谱法在生物样品药物定量分析中的基质效应[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(4): 476.
- [13] 孙怀玉,卢霞,孙敏耀,等. HPLC 法分析生物样品的前处理技术[J]. 化学分析计量, 2001, 10(3): 6.
- [14] 李章万,徐秀荣. 色谱分析中生物样品的前处理方法[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(1): 55.
- [15] SCHAEFER N, PETERS B, SCHMIDT P, et al. Development and validation of two LC-MS/MS methods for the detection and quantification of amphetamines, designer amphetamines, benzoylecgonine, benzodiazepines, opiates, and opioids in urine using turbulent flow chromatography[J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(1): 247.
- [16] BASSAN D, ERDMANN F, KRULL R. Quantitative determination of 43 common drugs and drugs of abuse in human serum by HPLC-MS/MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(1): 43.
- [17] 耿魁魁,段贤春,夏伦祝. 液质联用技术在中药药代动力学中的应用[J]. 安徽医药, 2010, 14(5): 505.
- [18] 李忠红,王玉,倪坤仪. LC-MSn 在药物分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(3): 341.
- [19] 张齐家,孙文军. 串联质谱及液质联用技术在药物分析研究中的应用[J]. 中医学报, 2009, 37(6): 111.
- [20] 钟大放,陈笑艳. 液相色谱-串联质谱法快速测定血浆样品中的药物浓度:在药代动力学研究中的应用[J]. 质谱学报, 2004, 25(增1): 120.
- [21] 叶显撑,范国荣,祝德秋. 液-质联用在体内药物分析中的应用[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(4): 317.