

使用Ostro样品前处理板结合UPLC/MS/MS对全血中的阿片类药物及其代谢物进行法医毒理学直接分析

Jonathan P. Danaceau, Erin E. Chambers and Kenneth J. Fountain
沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德）

应用优势

- 无需酶水解即可分析葡萄糖苷酸代谢物
- 适用于由22种阿片类药物和阿片类镇痛化合物构成的综合性药物组
- 与传统的LLE、SPE或蛋白质沉淀法相比，样品制备快速简单
- 去除了内源性磷脂质
- 对所有分析物和代谢物具有线性响应

沃特世解决方案

Ostro™ 96孔板

ACQUITY UPLC® BEH色谱柱

ACQUITY UPLC系统

Xevo® TQD质谱仪

关键词

阿片类药物，阿片类，UPLC，
法医毒理学，全血

简介

天然和合成阿片类药物一直是法医毒理学研究的一个重要方面。有比例相当高的犯罪和/或死亡事件都是由误用或滥用麻醉镇痛药（如羟考酮和氢可酮），以及非法阿片类药物海洛因所引起。法医实验室通常需要分析全血样本中的不同药物以确定确切的死亡原因，或是判断是否在药物作用下驾驶，或者出于其它犯罪或研究目的。过去，通常用酸或酶使样品水解并释放出葡萄糖苷酸代谢物之后再进行GC/MS分析¹。通过酶水解将葡萄糖苷酸代谢物转化为其游离形式的处理步骤增加了分析时间和成本，而且无法确保水解程度始终如一²。随着现代UPLC®/MS/MS技术的出现，如今可直接对葡萄糖苷酸代谢物进行分析³⁻⁶。

全血分析可采用多种样品制备方法，包括液液萃取（LLE）和固相萃取（SPE）。最简单的一种方法就是在细胞溶解之后进行蛋白质沉淀。本研究中介绍了一种快速直接的样品制备方法，采用Ostro样品制备板对全血样品进行预处理以裂解细胞，然后用乙腈沉淀，再用96孔板洗脱。所有样品预处理均在Ostro板孔中进行，无需离心或从各个离心管中转移样品。

样品制备完成之后，对22种阿片类药物及其代谢物进行UPLC/MS/MS分析。葡萄糖苷酸代谢物可直接进行分析，无需酶水解或化学水解。校准曲线呈线性，并可轻松达到相应的检测限。

实验

LC条件

系统:	ACQUITY UPLC
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 2.1 × 100 mm, 1.7 μm (部件号186002352)
柱温:	30 °C
进样体积:	10 μL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸的MilliQ水溶液
流动相B:	0.1%甲酸
梯度:	初始条件为2%的流动相B。流动相B在6 min内增加至47.2%，然后在0.5 min内返回至2%。重新平衡系统1.5 min。整个循环时间为8.0 min。

MS条件

质谱仪:	Xevo TQD
电离模式:	ESI+
采集模式:	MRM (离子通道参阅表1)
毛细管电压:	1 kV
碰撞能量 (eV):	针对具体化合物进行优化 (参阅表1)
锥孔电压 (V):	针对具体化合物进行优化 (参阅表1)

数据管理

Waters® MassLynx® 软件4.1版

样品描述

所有化合物和内标物 (IS) 均购自Cerilliant (德克萨斯州圆石)。另外, 除氢吗啡酮-3-葡萄糖苷酸、可待因-6-葡萄糖苷酸和去甲丁丙诺啡-葡萄糖苷酸之外, 所有化合物均有对应的氘代内标。对于这些化合物, 具有极为相似的响应的氘代IS, 被选择作为替代物。

所有化合物的混合储备液 (10 μg/mL; 芬太尼浓度为2.5 μg/mL) 用甲醇配制。工作溶液需每天以基质 (血液) 配制的高浓度标准品和QC样品制备, 并进行连续稀释以得到所需浓度。所有分析物的校准浓度范围为5至500 ng/mL, 但芬太尼的浓度配制为其它分析物浓度的25% (1.25至125.00 ng/mL)。所有内标混合储液 (5 μg/mL; 芬太尼为1.25 μg/mL) 用乙腈配制。

样品制备

在Ostro样品制备板的孔中加入150 μL 0.1 M ZnSO₄/0.1 M NH₄CH₃COOH的水溶液, 制备全血样品。向ZnSO₄/NH₄CH₃COOH溶液中加入50 μL全血样品, 并简单混合 (5 s), 使细胞裂解。然后, 在制备的样品中加入含有内标的乙腈600 μL。涡旋混合3 min之后, 将样品洗脱至96孔收集板, 在N₂下蒸干, 之后复溶于50 μL含0.1%甲酸的2%乙腈溶液中。取10 μL注入LC/MS/MS系统。

结果与讨论

表1中列出了22种筛选化合物和代谢物, 它们构成一组全面的化合物组, 包括天然阿片类药物、半合成阿片类及合成麻醉性镇痛化合物。这些化合物多数为弱碱性, 其pKa值大约为8至9。它们的极性范围较广, LogP值的范围为-3.48 (吗啡-3β-d-葡萄糖苷酸) 至5.0 (美沙酮)。所用MRM通道同见表1。除曲马朵和O-去甲基曲马朵之外, 均列出了主要MRM通道和确证MRM通道及其碰撞能量。

色谱图

从50 ng/mL校准标准品获得的所有化合物的代表性色谱图如图1所示。谱峰分配列于表1中。采用ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 2.1 × 100 mm, 1.7 μm色谱柱在5.5 min内完成所有分析物的分析，并且使吗啡-3-葡萄糖苷酸和氢吗啡酮-3-葡萄糖苷酸（化合物1和3）、吗啡和氢吗啡酮（化合物4和6）以及可待因和氢可酮（化合物9和13）等关键的异构体对之间达到基线分离。总循环时间为8.0 min。

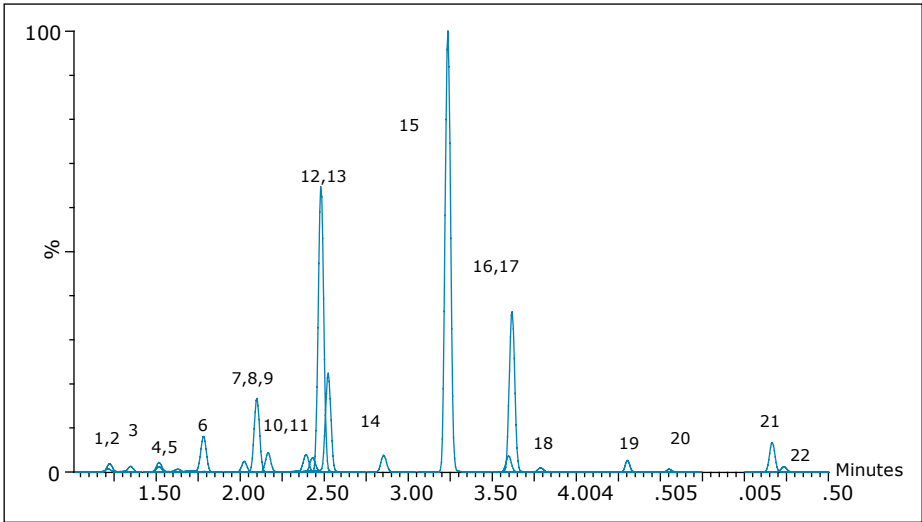


图1. 阿片类药物和合成镇痛化合物的色谱图。谱峰分配列于表1中。

化合物	保留时间	分子式	分子质量	MRM通道	锥孔电压	碰撞能量
1 吗啡-3β-D-葡萄糖苷酸	1.21	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	461.17	462.1>286.1, 201.1	58	30, 52
2 羟吗啡酮-3β-D-葡萄糖苷酸	1.21	C ₂₃ H ₂₇ NO ₁₀	477.16	478.1>284.1, 227.1	46	28, 50
3 氢吗啡酮-3β-D-葡萄糖苷酸	1.34	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	461.17	462.1>286.1, 185.1	58	28, 56
4 吗啡	1.50	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285.14	286.2>201.1, 165.1	54	28, 34
5 羟吗啡酮	1.61	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301.13	302.1>227.1, 242.1	44	28, 24
6 氢吗啡酮	1.76	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285.13	286.2>185.1, 157.1	66	32, 42
7 可待因-6β-D-葡萄糖苷酸	2.00	C ₂₄ H ₂₉ NO ₉	475.18	476.2>300.2, 165.2	60	36, 40
8 双氢可待因	2.07	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	301.17	302.2>199.1, 128.1	52	34, 58
9 可待因	2.14	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299.15	300.2>215.2, 165.1	54	26, 38
10 羟考酮	2.37	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	315.15	316.2>256.2, 241.1	44	26, 26
11 6-乙酰吗啡 (6-AM)	2.41	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.15	328.2>165.1, 211.1	60	26, 36
12 O-去甲基曲马多	2.46	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	249.17	250.2>58.0	26	18
13 氢可酮	2.50	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299.15	300.2>199.1, 171.0	60	30, 44
14 去甲丁丙诺啡-葡萄糖苷酸	2.83	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	589.29	590.3>414.3, 101.0	70	34, 54
15 曲马多	3.21	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	263.19	264.2>58.0	24	16
16 去甲哌替啶	3.58	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	233.10	234.1>160.1, 188.2	36	12, 18
17 哌替啶	3.60	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	247.16	248.2>174.1, 220.2	48	22, 20
18 去甲丁丙诺啡	3.77	C ₂₅ H ₃₅ NO ₄	413.26	414.3>101.0, 187.2	66	42, 34
19 芬太尼	4.29	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	336.22	337.2>188.2, 105.1	48	22, 38
20 丁丙诺啡	4.55	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	467.30	468.3>101.0, 396.3	72	40, 48
21 丙氧芬	5.18	C ₂₂ H ₂₉ NO ₂	339.30	340.3>266.2, 143.1	22	8, 32
22 美沙酮	5.25	C ₂₁ H ₂₇ NO	309.20	310.2>105.0, 223.1	32	22, 28

表1. 被测化合物的化学性质和MS条件。

回收率

本应用中，有机洗脱物的蒸发和在高水相溶液（2% ACN）中的复溶是有效防止溶剂效应的必要步骤，否则葡萄糖苷代谢物的色谱分析会受到干扰。图2显示了依照前文中Ostro详细方案从全血中提取的所有化合物的平均回收率。除三种最早洗脱的葡萄糖苷代谢物之外，其它所有化合物的回收率均为60%或以上，大多数化合物的回收率为80%或以上。

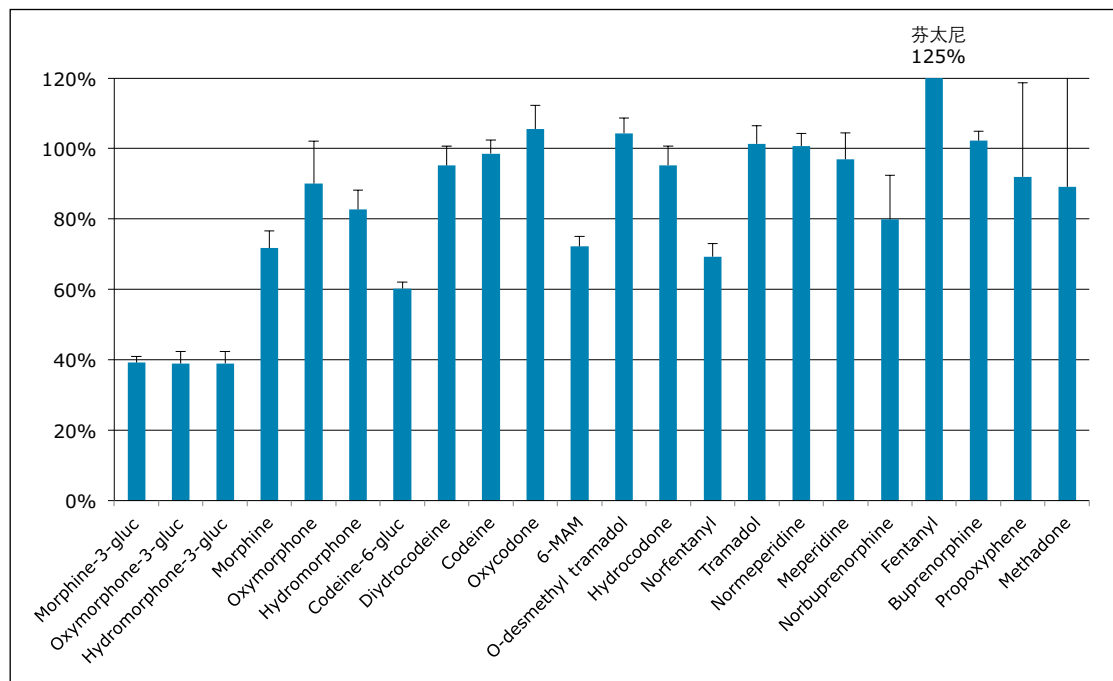


图2. 采用Ostro样品制备板从全血中提取的阿片类化合物的回收率。图中的条状柱表示全血样品的平均回收率 (N=4)。

线性和灵敏度

对本文所介绍的全血提取方法进行线性评估。配制的校准标准品在尿液中的浓度范围为5至500 ng/mL（芬太尼的浓度为1.25至125.00 ng/mL）。表2汇总了所有化合物的R²值、偏差%和CV%。所有化合物（除其中3种以外）的校准曲线全部校准点平均偏差均小于2%，平均CV%值均小于10%。需要特别指出的是，超过93%的校准品的浓度在其标称浓度的15%范围之内，且超过95%的校准品的校准点（N=3）CV%均小于15%。所有化合物的R²值均大于0.973，仅其中两种化合物小于0.98。结果表明，所有化合物在校准浓度范围内线性和灵敏度良好。浓度为5 ng/mL时，灵敏度最低的化合物羟吗啡酮-3-葡萄糖苷酸的UPLC/MS/MS信号至少高于空白全血提取样品信号的20倍。在大多数情况下，低浓度校准品的信号超出本方法空白样品信号的100倍。

化合物	R ²	准确度		CV%	
		平均值	标准	平均值	标准偏差
1 吗啡-3-β-d-葡萄糖苷酸	0.985	99.7	4.9	9.6%	4.6%
2 羟吗啡酮-3-β-d-葡萄糖苷酸	0.983	100.7	4.7	8.4%	6.6%
3 氢吗啡酮-3-β-d-葡萄糖苷酸	0.986	100.8	8.3	8.2%	3.8%
4 吗啡	0.986	101.0	7.4	10.0%	2.9%
5 羟吗啡酮	0.989	98.9	6.5	5.7%	3.3%
6 氢吗啡酮	0.988	99.4	8.1	4.6%	2.1%
7 可待因-6-β-d-葡萄糖苷酸	0.973	99.8	13.5	6.5%	4.2%
8 双氢可待因	0.984	99.8	11.4	7.0%	2.2%
9 可待因	0.979	101.1	14.1	4.3%	2.2%
10 羟考酮	0.986	99.0	12.4	4.4%	3.6%
11 6-乙酰吗啡（6-AM）	0.984	100.4	7.1	11.7%	3.4%
12 O-去甲基曲马多	0.990	100.3	6.7	5.2%	2.6%
13 氢可酮	0.990	100.5	6.8	5.5%	4.8%
14 去甲丁丙诺啡-葡萄糖苷酸	0.989	101.0	7.4	11.1%	6.9%
15 曲马多	0.988	100.5	10.2	3.4%	1.9%
16 去甲哌替啶	0.995	100.4	4.9	4.2%	2.6%
17 哌替啶	0.994	100.3	6.4	4.2%	2.3%
18 去甲丁丙诺啡	0.989	100.5	7.6	6.6%	4.4%
19 芬太尼	0.992	99.6	5.8	5.2%	2.3%
20 丁丙诺啡	0.994	100.3	5.5	5.5%	2.3%
21 丙氧芬	0.990	100.5	7.5	4.2%	1.7%
22 美沙酮	0.994	100.3	6.3	2.8%	0.4%

表2. 采用简单样品稀释方案制备的阿片类药物校准曲线的准确度和变异系数 (CV%)。芬太尼和去甲芬太尼的浓度为其它化合物浓度的 1/4。

结论

本研究介绍的方法展示了采用Ostro样品制备板结合UPLC/MS/MS对全血样品中的22种目标阿片类化合物及其代谢物进行分析。所有化合物的分析在5.5 min内完成，而且所有同位素化合物对达到完全分离。Ostro样品制备板的使用实现了快速的孔内细胞溶解和蛋白质沉淀，以及随后洗脱至96孔收集板。与在单个试管中进行蛋白质沉淀相比，此方法提高了样品通量，并且有效地消除了内源性磷脂质化合物。所有分析物在整个校准浓度范围内显示出良好的线性，而且本方法可在最低校准点浓度下实现灵敏可靠的检测。

参考文献

1. Goldberger BA, Cone EJ. Confirmatory tests for drugs in the workplace by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1994; 674(1-2): 73-86.
2. Wang P, *et al*. Incomplete recovery of prescription opioids in urine using enzymatic hydrolysis of glucuronide metabolites. *Journal of Analytical Toxicology*. 2006; 30(8): 570-575.
3. Gustavsson E, *et al*. Validation of direct injection electrospray LC-MS/MS for confirmation of opiates in urine drug testing. *Journal of Mass Spectrometry*. 2007; 42(7): 881-889.
4. Murphy CM, Huestis MA. LC-ESI-MS/MS analysis for the quantification of morphine, codeine, morphine-3- β -D-glucuronide, morphine-6- β -D-glucuronide, and codeine-6- β -D-glucuronide in human urine. *Journal of Mass Spectrometry*. 2005; 40(11): 1412-1416.
5. Edinboro L, Backer RC, Poklis A. Direct analysis of opiates in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 2005; 29(7): 704-710.
6. French D, Wu A, Lynch K. Hydrophilic interaction LC-MS/MS analysis of opioids in urine: significance of glucuronide metabolites. *Bioanalysis*. 2011; 3(23): 2603-2612.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, Xevo, MassLynx和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。Ostro是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 年沃特世公司。印制于中国。2013年5月 720004673ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com