

GC/MS分析尿液中丁丙诺啡*

刘冬娴¹, 徐连生², 伍岚³

(1. 湖南公安高等专科学校刑事技术系, 长沙 410138; 2. 湖南省公安科学技术研究所, 长沙 410001;

3. 湖南省株洲市公安局刑侦支队, 株洲 412000)

摘要 目的: 建立尿液中丁丙诺啡 GC/MS 分析方法。方法: 在含丁丙诺啡的尿液中, 加入 β -葡萄糖醛酸酶溶液, 50℃ 水解 2 h, 加入内标长春西汀, 加 pH 7 缓冲溶液, 用三氯甲烷提取, 提取物经 *N*, *O*-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺衍生化后进行 GC/MS 分析。GC/MS 条件: HP-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m) 石英毛细管柱, 柱温: 初温 240℃ 保持 2 min, 以 20℃·min⁻¹ 速率升至 280℃ 保持 18 min。结果: 线性范围为 0.5~100 μ g·L⁻¹, 检出限为 0.2 μ g·L⁻¹。结论: 该方法灵敏度高, 可用于涉毒案件尿液中丁丙诺啡的分析。

关键词: 丁丙诺啡; 衍生化; GC/MS 分析; 尿液

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)05-0787-04

GC/MS determination of buprenorphine in urine*

LIU Dong-xian¹, XU Lian-sheng², WU Lan³

(1. Criminal Technology Department Hunan Public Security College, Changsha 410138, China

2. Science & Technology Research Center, Department of Public Security of Hunan Province, Changsha 410001, China

3. Technical Center, Criminal Investigation Division, Zhuzhou Municipal Public Security Bureau, Zhuzhou 412000, China)

Abstract Objective To develop a method for determination of buprenorphine in urine by GC/MS. **Method** After hydrolysis with β -glucuronidase in 50℃ water bath for 2 h, the urine samples were spiked with vinpocetine (internal standard) and pH 7 buffer solution, and then extracted with chloroform. The extracts were derivatized with *N*, *O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. The samples were separated with a HP-5 MS quartz capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m) and determined by GC-MS. **Results** The detection limit and linear range of analysts in urine were 0.2 μ g·L⁻¹ and 0.5~100 μ g·L⁻¹ respectively. **Conclusion** The method is sensitive enough to be applied to the forensic identification.

Key words buprenorphine; derivatization; GC-MS; urine

丁丙诺啡 (buprenorphine) 系蒂巴因衍生物, 化学名称为 21-环丙基-7 α [(*S*)-1-羟基-1,2,2-三甲基丙基]-6,14-桥亚乙基-6,7,8,14-四氢东罂粟碱, 其化学结构与吗啡相似。丁丙诺啡在药用中对急慢性、中强度疼痛有良好的疗效, 是强效镇痛药物, 对于海洛因、可卡因、二氢埃托啡等依赖性戒断效果较好^[1]。丁丙诺啡属一类精神药品, 人体对丁丙诺啡具有依赖性和成瘾性, 2003 年以来丁丙诺啡滥用情况严重, 许多吸毒者将丁丙诺啡含片作为海洛因的替代品, 因此近年来丁丙诺啡已成为司法鉴定中较常见的分析目标物之一。对于丁丙诺啡的检验, 目前国内有 HPLC 法测定盐酸丁丙诺啡

片的含量^[2]、薄层色谱法检测丁丙诺啡^[3]、微波照射衍生化气相色谱法检测丁丙诺啡^[4]、固相萃取 GC/NPD 检测血浆中丁丙诺啡^[5]、尿液中丁丙诺啡提取方法研究^[6]、GC/NPD 检测尿液中丁丙诺啡^[7]、固相萃取 GC/MS (SM) 法检测尿中沙啡^[8]的报道, 国外有 GC-ECD^[9]、GC/MS^[10-12]、LC/MS^[13-17] 分析丁丙诺啡的报道。本文建立了尿液中丁丙诺啡 GC/MS 分析方法, 该方法灵敏度高, 可用于尿液中丁丙诺啡的分析。

1 仪器与试剂

美国 Agilent 6890N GC/Agilent 5975B MS 气 /

* 公安部科研项目公科研 [2004] 163 号

第一作者 Tel: (0731) 2791671 E-mail: liudongxian@yahoo.com.cn

质联用仪, Agilent MSD Chem station 工作站。

盐酸丁丙诺啡对照品, 购自公安部二所。N, O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(1% 三甲基氯硅烷) [BSTFA (1% TMCS)], 购自 Sigma 公司。

β -葡萄糖醛酸酶: 购自美国 Sigma 公司, 冻干固体(货号 G7396-25KU), 临用时配制成 20000 单位 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液。

pH 7.0 缓冲溶液: 称取 6 g 磷酸二氢钠溶于 250 mL 蒸馏水中, 称取 1 g 氢氧化钠溶于 250 mL 蒸馏水中; 分别量取上述的磷酸二氢钠溶液 62.5 mL 和氢氧化钠溶液 72.7 mL 于 250 mL 量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度。

对照品储备液: 称取盐酸丁丙诺啡 10.78 mg (折算成丁丙诺啡 10.00 mg), 用 50 mL 甲醇溶解, 定容至 250 mL, 配制成 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丁丙诺啡对照品储备液, 用时以甲醇稀释成 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准工作液。

内标溶液: 称取长春西汀 5.00 mg 用 10 mL 甲醇溶解, 定容至 50 mL, 配制成 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的长春西汀对照品储备液, 用时以甲醇稀释成 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准工作液。

三氯甲烷、苯均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。空白尿液: 健康、近期末服用药物的正常人体的新鲜尿液。

2 方法与结果

2.1 方法 取待检尿液 1 mL, 加 β -葡萄糖醛酸酶溶液 0.1 mL, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水解 2 h, 加 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 长春西汀内标溶液 100 μL , pH 7 缓冲溶液 1 mL, 三氯甲烷 5 mL, 涡旋 5 min, 3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min (离心半径 5 cm), 分取有机相, 重复 1 次, 合并提取液, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气流下吹干, 加苯 100 μL , BSTFA (1% TMCS) 40 μL , 560 W 微波照射衍生化 3 min, 吹干, 用 50 μL 苯溶解残余物, 取 1 μL 进行 GC/MS 分析。GC/MS 条件: HP-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm) 石英毛细管柱; 进样口温度 290 $^{\circ}\text{C}$; 载气: 高纯氮, 不分流, 恒流模式 (流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$); 柱温: 初温 240 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min 以 20 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 速率升至 280 $^{\circ}\text{C}$ 保持 18 min; AUX 温度 280 $^{\circ}\text{C}$, EI 源, 离子源温度: 230 $^{\circ}\text{C}$, MS 四极杆温度: 150 $^{\circ}\text{C}$; EM 电压: 200 V; 选择性离子监测 (SM), 丁丙诺啡 m/z 为 450.3, 482.3, 506.2, 长春西汀 m/z 为 280.1, 321.2, 350.2。

2.2 回归方程与线性范围 取 10 mL 离心试管 10 支, 分别加入 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丁丙诺啡标准工作

液 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 μL , 各加入 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 长春西汀内标溶液 100 μL , 混合, 吹干, 分别加入空白尿液 1 mL, 涡旋 5 min, 配制成分别含丁丙诺啡 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng 含内标长春西汀 10 ng 的尿检材, 将尿检材按“2.1”项下方法进行提取、GC/MS 分析, 以丁丙诺啡与长春西汀色谱峰面积比为 Y , 以丁丙诺啡浓度为 $X (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 进行线性回归, 回归方程为:

$$Y = 4.5 \times 10^{-2} X + 0.02 \quad r = 0.9993$$

线性范围为 0.5~100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 检出限、定量限测定 色谱峰高相当于基线噪音 3 倍的浓度确定为检出限, 检出限为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 色谱峰高相当于基线噪音 10 倍的浓度确定为定量限, 定量限为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 回收率 取 10 mL 离心试管 15 支, 分为 3 组, 每组分别加入 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丁丙诺啡标准工作液 20, 100, 500 μL , 各加入 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 长春西汀内标溶液 100 μL , 混合, 吹干, 分别加入空白尿液 1 mL, 涡旋 5 min, 配制成分别含丁丙诺啡 2, 10, 50 ng 含内标长春西汀 10 ng 的尿检材, 将尿检材按“2.1”项下方法进行提取、进样分析。另分别取 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丁丙诺啡标准工作液 20, 100, 500 μL , 均加入 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 长春西汀内标溶液 100 μL , 混合, 吹干, 加苯 100 μL , 加 BSTFA (1% TMCS) 40 μL , 560 W 微波照射衍生化 3 min, 吹干, 用 50 μL 苯溶解残余物, 取 1 μL 进行 GC/MS 分析。由经提取与未经提取分析所得色谱图中丁丙诺啡与长春西汀的色谱峰面积比计算丁丙诺啡的回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率 ($n=5$)

Tab 1 Recovery

添加浓度 (added) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	测定浓度 (found) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率 (recovery) %	RSD %
2	1.65	82.7	7.5
10	9.31	93.1	6.9
50	47.73	95.5	3.0

2.5 服药志愿者尿液分析 2 名健康、近期末服任何药物的志愿者各口服丁丙诺啡含片 0.8 mg 分别取服药前及服药后第 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h 尿液各 2 mL, 按“2.1”项下方法进行提取、进样分析, 由“2.2”项下线性回归方程求得尿液中丁丙诺啡的浓度, 结果见表 2。

表 2 志愿者尿液中丁丙诺啡浓度

Tab 2 Buprenorphine concentration in urine of volunteers

取样时间 (time) / h	取样量 (volume) / mL	志愿者 I (volunteer I) / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	志愿者 II (volunteer II) / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
0	2	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)
0.5	2	2.39	5.44
1	2	1.93	4.98
2	2	26.5	16.96
4	2	5.92	3.97
6	2	0.53	5.30
8	2	2.00	3.83
12	2	0.47	3.07
24	2	0.76	1.68
36	2	0.23	2.57
48	2	0.22	2.75

3 讨论

3.1 色谱分离 空白尿液及服药后尿液 (含内标长春西汀 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 按“2.1”项下方法进行分析, 丁丙诺啡、长春西汀质谱扫描图见图 1, 总离子流图见图 2。由图可见, 该色谱条件下丁丙诺啡、长春西汀都得到了分离, 检材中内源性杂质对分析几乎无干扰。在本文的 GC/MS 条件下, 长春西汀衍生物出峰时间 8.03 min , 丁丙诺啡衍生物出峰时间 18.63 min 。

3.2 萃取方法比较 本文考察了尿液中丁丙诺啡固相萃取方法, 取待检尿液 1 mL , 加 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 长春西汀内标溶液 $100 \mu\text{L}$, 加 $\text{pH } 10.8$ 缓冲液 1 mL , 涡旋 5 min , 取细长玻璃管 1 支 (长 17 cm , 内径 7 mm), 底部塞少许脱脂棉, 装 401 有机担体 3 cm^3 , 用 6 mL 甲醇活化, 用 6 mL 蒸馏水洗去甲醇; 将检尿过柱, 用 6 mL 蒸馏水洗去水溶性杂质, 再用 6 mL 三氯甲烷洗脱, 收集洗脱液于试管中, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min (离心半径 5 cm), 分取有机相, 于 50°C 水浴中氮气流下吹干, 加苯 $100 \mu\text{L}$, 加 BSTFA ($1\% \text{ TMCS}$) $40 \mu\text{L}$, 560 W 微波照射衍生化 3 min , 吹干, 用 $50 \mu\text{L}$ 苯溶解残余物, 取 $1 \mu\text{L}$ 进行 GC 分析。实验结果表明: 固相萃取的萃取率稍低于液相萃取, 且萃取时间较长, 因此本文选择液相萃取方法。

3.3 检测方法比较 目前国内报道的丁丙诺啡检验方法中, 薄层色谱法^[3]快速、简便, 但检测灵敏度不高 (灵敏度为 $0.5 \mu\text{g}$), 适用于盐酸丁丙诺啡含片或滥用者配制的丁丙诺啡注射器的检测; HPLC 法^[1]应用于盐酸丁丙诺啡含片的检测; GC/NPD 法^[5,7]灵敏度较高, 操作简便, 仪器要求不高, 但需用丁丙诺啡对照品比对分析; 固相萃取 GC/MS(SM) 法^[8]因未对尿液检材进行水解, 从而只能检测尿液中游离型丁丙诺啡的含量, 不能检测尿液中丁丙诺啡总的含量, 且分析

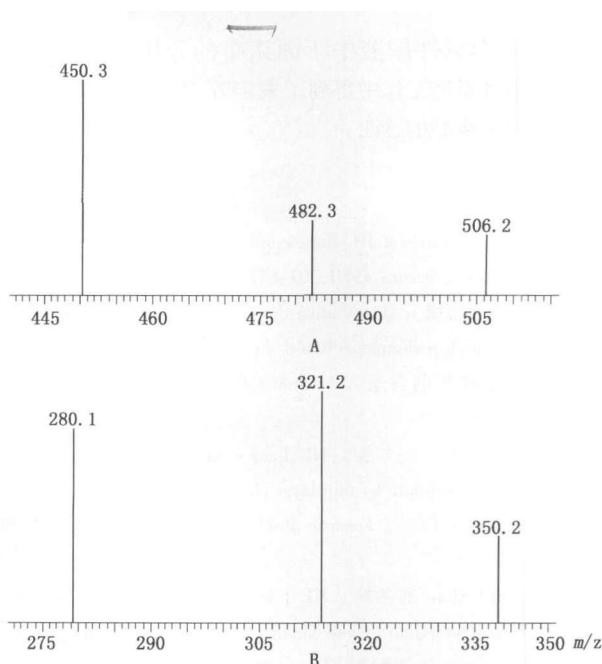


图 1 丁丙诺啡(A)和长春西汀(B)衍生物的质谱扫描图

Fig 1 Mass spectra of buprenorphine derivative (A) and vinpocetine derivative (B)

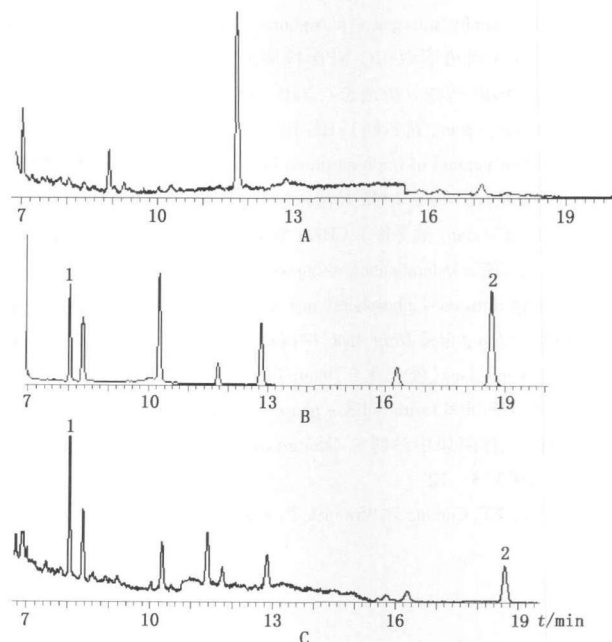


图 2 空白尿液(A)、空白尿液添加丁丙诺啡、内标长春西汀(B)和服药后 1 h 尿液添加内标长春西汀(C)衍生化后的总离子流图

Fig 2 Total ion current chromatograms of derivative in blank urine (A), blank urine spiked with standard buprenorphine ($50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and internal standard vinpocetine (B), and volunteer urine 1 h after administration spiked with internal standard vinpocetine (C)

1. 长春西汀衍生物 (vinpocetine derivative) 2. 丁丙诺啡衍生物 (buprenorphine derivative)

时间较长。本文所建立的 GC/MS 分析尿液中丁丙诺啡的方法回收率高, 检测灵敏度高 (定量限为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 检测结果准确可靠, 且该方法操作简便,

可用于涉毒案件尿液中丁丙诺啡的分析。

致谢: 本研究工作中得到了宋定芳、王金山等同学的帮助, 在此表示衷心的感谢。

参考文献

- 1 Melib NK, Mendelson JH. Buprenorphine suppresses heroin use by heroin addicts *Science*, 1980, 207: 657
- 2 HAN Mei(韩梅). Quantitative determination of buprenorphine in tablets by high performance liquid chromatography(HPLC法测定盐酸丁丙诺啡片的含量). *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 1998, 13(4): 149
- 3 LU Dong-xian(刘冬娴), HE Jiang-nan(贺江南). Determination of buprenorphine by thin layer chromatography(薄层色谱法检测丁丙诺啡). *Chin J Forensic Med* (中国法医学杂志), 2007, 22(4): 242
- 4 LU Dong-xian(刘冬娴), HE Jiang-nan(贺江南). Determination of buprenorphine by gas chromatography with derivatization under microwave(微波照射衍生化气相色谱法检测丁丙诺啡). *Chin J Spectrosc Lab*(光谱实验室), 2007, 24(5): 987
- 5 LU Dong-xian(刘冬娴), HE Jiang-nan(贺江南), XU Lian-sheng(徐连生). Determination of buprenorphine in plasma by gas chromatography/nitrogen-phosphorus detector with solid-phase extraction(固相萃取 GC/NPD 检测血浆中丁丙诺啡). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(8): 1325
- 6 LU Dong-xian(刘冬娴), HE Jiang-nan(贺江南). A study in extraction method of buprenorphine in urine(尿液中丁丙诺啡提取方法研究). *J Forensic Med*(法医学杂志), 2007, 23(4): 292
- 7 LU Dong-xian(刘冬娴), CHEN Wen-bin(陈文斌), HE Jiang-nan(贺江南). Determination of buprenorphine in urine by gas chromatography/nitrogen-phosphorus detector(GC/NPD检测尿液中丁丙诺啡). *Chin J Med Drug Appl*(中国现代药物应用), 2008, 2(12): 1
- 8 HOU Yun-long(侯云龙). Determination of buprenorphine in urine by GC/MS(SM) with solid-phase extraction(固相萃取 GC/MS(SM)法检测尿中沙啡). *Guangdong Gong'an Keji*(广东公安科技), 2003(3): 12
- 9 Everhart ET, Cheung P, Shwonek P, *et al*. Subnanogram concentration measurement of buprenorphine in human plasma by electron capture capillary gas chromatography: application to pharmacokinetics of sublingual buprenorphine *Clin Chem*, 1997, 43(12): 2292
- 10 Lisi AM, Kazlauskas R, Trout G J. Gas chromatographic-mass spectrometric quantitation of urinary buprenorphine and norbuprenorphine after derivatization by direct extractive alkylation. *J Chromatogr B*, 1997, 692: 67
- 11 Gopal S, Tzeng TB, Cowan A. Characterization of the pharmacokinetics of buprenorphine and norbuprenorphine in rats after intravenous bolus administration of buprenorphine *Eur J Pharm Sci*, 2002, 15: 287
- 12 Gopal S, Tzeng TB, Cowan A. Development and validation of a sensitive analytical method for the simultaneous determination of buprenorphine and norbuprenorphine in human plasma *Eur J Pharm Sci*, 2001, 51: 147
- 13 Pimay S, Herve F, Bouchonnet S, *et al*. Liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric quantitative analysis of buprenorphine, norbuprenorphine, nortizapam and oxazepam in rat plasma *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41: 1135
- 14 Ceccato A, Klinkenberry R, Hubert P, *et al*. Sensitive determination of buprenorphine and its N-dealkylated metabolite norbuprenorphine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 32: 619
- 15 Yue J, Borenstein MR, Jansen SA, *et al*. Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of buprenorphine and its N-dealkylated metabolite norbuprenorphine in rat brain tissue and plasma *J Pharm Toxicol Methods*, 2005, 52: 314
- 16 Moody DE, Sawson MH, Strain EC, *et al*. 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 *Anal Biochem*, 2002, 306: 31
- 17 Poletti A, Huestis MA. Simultaneous determination of buprenorphine, norbuprenorphine and buprenorphine-glucuronide in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2001, 754: 447

(本文于 2008 年 4 月 17 日收到)