

人尿中环丁甲羟氢吗啡及其代谢物的 GC/MS 分析研究

申 利 徐友宝 吴 琦 王 杉 张长久
(国家体委运动医学研究所兴奋剂检测中心 北京 100029)

[摘要]环丁甲羟氢吗啡阳性尿经酸解、醚洗、乙酸乙酯-异丙醇提取、衍生化后,用 GC/MSD 进行分析,检出了环丁甲羟氢吗啡及其 1 种代谢物,方法灵敏简便。

关键词:环丁甲羟氢吗啡 代谢物 气相色谱-质谱

环丁甲羟氢吗啡(Nalbuphine, NA)是 1 种强效的麻醉镇痛剂,它与吗啡的镇痛强度相似,但作用时间较长。在体育竞赛中,运动员利用它减轻受伤后的痛感并产生心理亢奋,提高运动成绩,所以被国际奥委会(IOC)禁用。

关于环丁甲羟氢吗啡的分析研究,国内外已有一些从尿和血液中检测的报道,常用的方法有电子捕获 GLC^[1]、HPLC^[2,3]、GC/NPD^[4]和 GC/MS^[3,4],但对代谢物的 GC/MS 检测尚未见报道。本文采用 GC/MSD 对环丁甲羟氢吗啡的代谢进行了研究,给出了从人尿中检测 NA 原形药物及其主要代谢物的快速灵敏准确的方法。

1 实验部分

1.1 药品与试剂

环丁甲羟氢吗啡(Nalbuphine, NA, 加拿大 INRS-Sante 提供);吗啡(Morphine, MO, 内标, 卫生部药品检定所);L-半胱氨酸(Gysteine, Merck);MSTFA(N-甲基-N-三甲基硅基三氟乙酰胺, Sigma);MBTFA(N-甲基-双三氟乙酰胺, Sigma);TMSI(三甲基碘硅烷, Aldrich Chemical CO.);其它均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与操作条件

HP-5890A-HP5970B 型气相色谱质谱联用仪;HP-5 交联柔性石英毛细管柱(25m×0.2mm);柱温 180℃ $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ 220℃ $\xrightarrow{5^\circ\text{C}/\text{min}}$ 260℃ $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ 280℃(10min);进样口温度 250℃;检测器温度 300℃;离子源温度 200℃;载气为氦气,流速 0.96mL/min;电子能量 70eV;倍增器电压为 2400V;全扫描采集(SCAN)或选择离子监测(SIM);质量范围 40~600amu。

1.3 实验步骤

1993 年 11 月 27 日收

阳性尿采集:青年女性志愿者口服盐酸环丁甲羟氢吗啡标准品 10mg 后,收集 0~48h 内所有尿液,置于 -20℃ 冰柜中保存。

尿样提取:取 5mL 阳性尿,加入 1 μ g 内标、100mg 半胱氨酸和 0.5mL 浓盐酸,于 100℃ 下加热水解 30min,冷却后加入 3mL 乙醚,振荡 10min,离心 5min,弃去有机相,水中再加入 0.6mL 12mol/L NaOH 溶液及 2g 固体缓冲剂(NaHCO₃ : K₂CO₃ = 3 : 2),混匀,加入 3mL 乙酸乙酯:异丙醇=9 : 1 的提取液,振荡 10min,离心 5min,取有机相在氮气流下挥干供衍生化。

衍生化:(1)混合衍生化,向残渣中加入 100 μ L MSTFA,70℃ 下反应 10min,再加入 30 μ L MBTFA,70℃ 下继续反应 10min;(2)MSTFA 衍生化,残渣中加入 130 μ L MSTFA,70℃ 下反应 20min;(3)MSTFA/TMSI 衍生化,残渣中加入 127 μ L MSTFA 和 3 μ L TMSI 溶液^[5],70℃ 下反应 20min。衍生化后各取 2 μ L 于 GC/MSD 上进样分析。

2 结果与讨论

2.1 尿中环丁甲羟氢吗啡及其代谢物的检出

按上述方法对尿样进行处理,通过与空白尿的色谱图相比较,可在 1~36h 内的尿中检出 NA 药物原形及 1 个代谢物 M(I) (图 1),相应的质谱图见图 2。通过质谱图及药物代谢规律,可知 M(I) 为 NA 的氧化产物(图 3)。

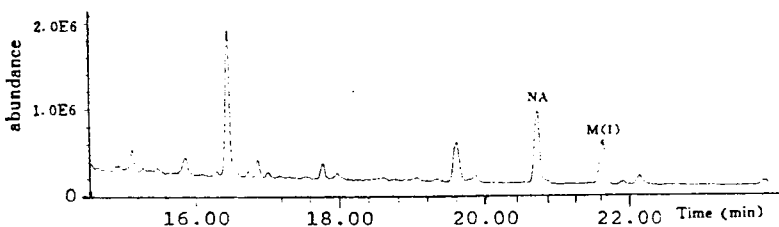


图 1 NA 及其代谢物 TMS 衍生化的 TIC 图

NA 及 M(I) 的质谱解析如下:

NA-3TMS:

$M^+ = 573, M^+ - \diamond - \text{TMSOH} = 428, M^+ - \diamond = 518, M^+ - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2 - \diamond - \text{TMSOH} = 372$ 。

M(I)3TMS(其中 1 个 TMS 为环上羰基烯醇化后所得):

$M^+ = 571, M^+ - \text{CH}_3 - \text{TMSOH} = 466, M^+ - \text{CH}_2 = \text{CHNCH}_2 - \diamond - \text{TMSOH} = 371$ 。

Carol 等曾讨论过 NA 在血浆中的 2 种代谢途径^[3],本文在尿中仅检出 1 种代谢物。原因可能是环丁甲羟氢吗啡与吗啡结构相似,其代谢模式也应相近,已有人做过研究^[6],吗啡的 N-去甲基代谢物去甲吗啡含量极小,不易检出,所以环丁甲羟氢吗啡经 N-去烷基途径代谢的也很少,本文所用方法不能检出。

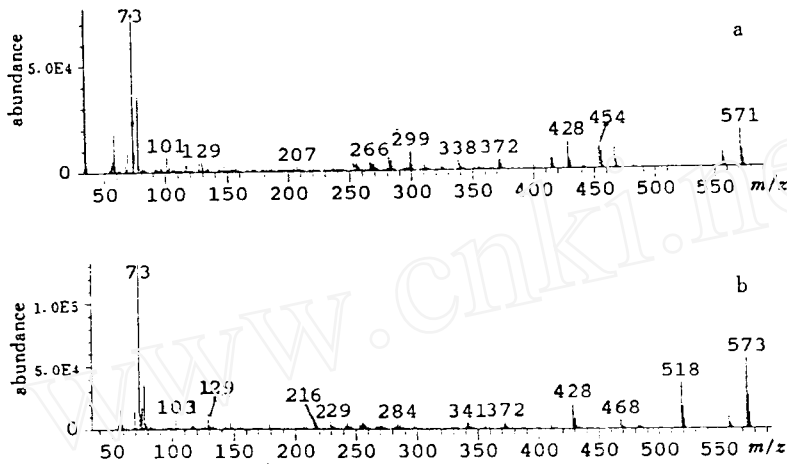


图 2 NA 及其代谢物 TMSA 衍生化的质谱图
a. M(I)-3TMS b. NA-3TMS

2.2 尿药浓度变化

将 0~48h 阳性尿按前述步骤处理, 衍生化后进样, 选择原形药物和代谢物的基峰(分别为 m/z 573 和 571)作为选择离子, 以峰高对时间作图(图 4), 可见环丁甲羟氢吗啡的作用产生比较快, 在服药 3h 后药物原形和代谢物浓度即达到最大值, 服药 36h 内可查出原形药物及代谢物。

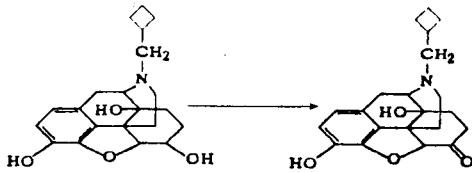


图 3 口服 NA 代谢途径

2.3 衍生化

NA 药物原形及代谢物均含有多个羟基, 为降低其极性, 增加挥发性, 需进行衍生化后进行 GC 分析。通过用 MSTFA 单独衍生化、MSTFA/MBTFA 混合衍生化及用 MSTFA/TMSI 衍生化进行比较, 对原形药物来说, 用 MSTFA/TMSI 衍生化最好, 峰高为其它 2 种衍生化的 2 倍左右。但对 M(I)来说,

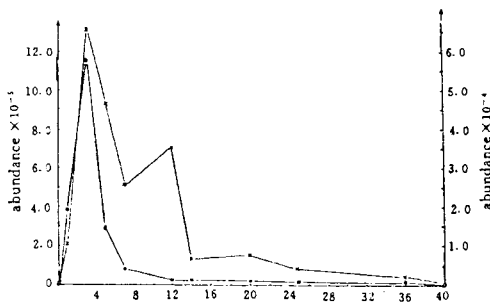


图 4 人尿中 NA 及其代谢物浓度变化 ○-NA, ×-M

只有混合衍生化才能得到合理的质谱图。用 MSTFA/TMSI 和 MSTFA 衍生化均不出峰, 其反应机理尚待研究。

2.4 回收率和检测限

取 6 份空白尿,向其中 3 份尿中加入 NA $5\mu\text{g}$,6 份尿按提取步骤处理,向另外 3 份尿提取的残渣中加入 $5\mu\text{g}$ NA,衍生化后进样,前 3 份尿与后三份尿的峰高比即为回收率,结果为 $80.7\pm 7.7\%$ ($n=3$)。

取标准品按上述方法处理,以 $m/z573$ 为选择离子,得出检测限为 25pg (信噪比=2)。

参 考 文 献

- 1 Stephen H Weinstein *et al.* Quantitative Determination of Nalbuphine in Plasma Using Electron-Capture Detection. *J Pharm Sci*, 1978, 67, 547
- 2 P Kintz *et al.* Determination of Nalbuphine Using High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Photodiode-Array Detection and Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *J Chromatogr*, 1992, 573, 172
- 3 Carol L Lake *et al.* High- Performance Liquid Chromatographic Analysis of Plasma Levels of Nalbuphine in Cardiac Surgical Patients. *J Chromatogr*, 1982, 233, 410
- 4 徐妍青等. 尿中羟甲左吗喃、氢苯度冷丁、环丁甲羟氢吗啡及香草酰二乙胺的分析. *药化学报*, 1991, 26, 606
- 5 张霁等. 尿中多种蛋白同化激素的 GC/MS 分析及代谢研究. *药化学报*, 1991, 26, 598
- 6 沈克温等. 实用药物分离鉴定手册, 人民军医出版社, 1986, 721

Analysis of Nalbuphine and Its Metabolite in Human Urine by GC/MS

Shen Li, Xu Youxuan, Wu Yun, Wang Shan, Zhang Changjiu
(China Doping Control Centre, National Research Institute of
Sports Medicine, Beijing 100029, China)

Received 1993-11-27

Abstract

A GC/MS method for the analysis of nalbuphine and its major metabolite is described. The urine sample was acid hydrolyzed, cleaned with diethyl ether, extracted with ethyl acetate/isopropanol, and derivatized with MSTFA-MBTFA. Nalbuphine and one of its metabolites were detected in urine sample within 1-36 h after administration of the drug. The method is fast and sensitive.

Key Words: nalbuphine, metabolite, GC/MS