

简便快速测定人体血浆中吗啡含量的 RP-HPLC 法*

黄洪勇¹, 职晓燕¹, 张瑞岭^{1△}, 师天元^{1,2}

(1. 新乡医学院第二附属医院, 河南新乡 453002; 2. 河南省生物精神病学重点实验室, 河南新乡 453002)

摘要:目的 建立 RP-HPLC 法测定人体血浆中吗啡的含量。方法 色谱柱为美国 Diamonsil® (250×4.6 mm, 5 μm) C₁₈ 反相柱; 流动相为甲醇-缓冲液 (5 mL 三乙胺加入 1 000 mL 水中, 磷酸调 pH 值 7.0)=80:20, 流速为 1.3 mL/min; 检测波长 233 nm。结果 吗啡血浆浓度在 1.8~921.6 ng/mL 范围内, 线性关系良好, 标准曲线为 $C=0.9627F-0.0196$ ($r=0.9997, n=8$), 定量下限 1.8 ng/mL。结论 本方法具有快速、简便、灵敏度高、重现性好等优点, 可以用于吗啡临床研究和不良反应监测。

关键词:快速测定; 吗啡; 反相高效液相色谱法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.23.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)23-2392-02

Rapid monitoring of morphine in plasma by RP-HPLC*

Huang Hongyong¹, Zhi Xiaoyan¹, Zhang Ruiling^{1△}, Shi Tianyuan^{1,2}

(1. The Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453002, China;

2. Key Laboratory of Henan Provincial Biological Psychiatry, Xinxiang, Henan 453002, China)

Abstract: Objective To establish determination of morphine in plasma by RP-HPLC. Methods Column was Diamonsil® C₁₈ (250×4.6 mm, 5 μm); Mobile phase was MeOH; Buffer (80:20, V/V), the flow rate was 1.3 mL/min; UV wavelength was 233 nm. Results Within a concentration range of 1.8–921.6 ng/mL, the standard curve of Morphine was $C=0.9627F-0.0196$ and had a good linearity ($r=0.9997, n=8$). The lower limit of quantitation was 1.8 ng/mL. Conclusion It appears to be a rapid, convenient, sensitive and reproducible method for clinical research and adverse reaction monitor of Morphine.

Key words: rapid monitoring; morphine; RP-HPLC

吗啡(morphine)为阿片类生物碱, 是一类具有依赖性的麻醉药品。由于该药品的特殊性, 治疗窗口窄, 人体内的含量测定在吗啡滥用、依赖与戒断相应研究, 寻找合适给药途径与药动学研究中意义重大。作者根据国内外文献方法, 进行条件优化, 建立了较为简便的人体血浆中吗啡反相高效液相色谱(RP-HPLC)定量分析法, 并应用于人体血浆中吗啡含量的测定。该方法快速、简便、灵敏度高、重现性好, 可以广泛满足吗啡的临床研究和滥用快速检测。

1 材料与与方法

1.1 仪器与材料 美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪; 瑞士 XT-120A 电子分析天平; 丹麦 ULTRE FREEZE-3410 超低温冰箱; 江苏 XK96-A 快速旋涡混合器; 上海 LXJ-II 离心沉淀机。吗啡对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 171201-200318); 内标物氯氮平(美国 Sigma 公司, 批号: 010K1204); 甲醇为色谱纯; 其余试剂为分析纯; 水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: 美国 Diamonsil® (250×4.6 mm, 5 μm) C₁₈ 反相柱, 柱温: 30 °C; 流动相: 甲醇-缓冲液 (5 mL 三乙胺加入 1 000 mL 水中, 磷酸调 pH 值 7.0)=80:20, 流速: 1.3 mL/min; 测波长: 233 nm; 进样量: 20 μL。

1.2.2 对照品溶液制备 取吗啡对照品约 10 mg, 精密称定, 加甲醇溶解, 转移至 100 mL 容量瓶中, 定容刻度, 即得。于冰箱 4 °C 保存备用, 临用前用甲醇稀释成所需浓度。依法制备出 10 μg/mL 氯氮平甲醇溶液为内标液。

1.2.3 血浆样品处理 取 400 μL 含药血浆加至 10 mL 具塞锥形玻璃离心管中, 加入内标液 100 μL, 漩涡振荡 1 min, 加入乙酸乙酯 5 mL, 漩涡振荡提取 2 min, 4 000 r/min 离心 10

min, 取有机层置于一干燥具塞尖底试管中, 离心管中再加入乙酸乙酯 5 mL, 同法操作。震荡混合 2 次提取液, 40 °C 水浴氮气吹干, 残渣用 100 μL 流动相复溶后, 4 000 r/min 离心 10 min, 取 20 μL 进样。

2 结果

2.1 专属性考察 在上述色谱条件下, 血浆内源性物质、代谢物及其他杂质不干扰主峰的分离和测定, 内标和吗啡保留时间分别为 6.5 min 和 11.2 min。吗啡的有效塔板数为 5 000, 分离度 18.9, 拖尾因子 1.03。见图 1。

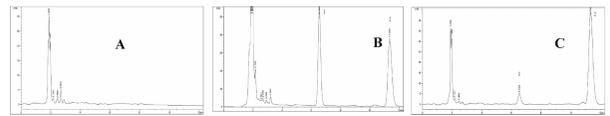


图 1 吗啡测定色谱图

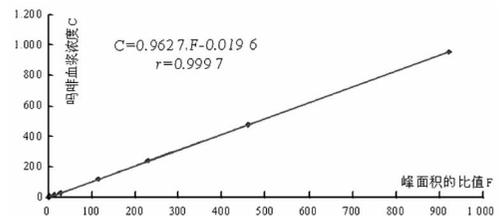


图 2 吗啡测定标准曲线图

2.2 线性关系考察及灵敏度试验 取空白血浆 300 μL 共 8 份, 分别加入吗啡系列对照品溶液 100 μL, 使血浆中药物浓度分别相当于 1.8、3.6、14.4、28.8、115.2、230.4、460.8、921.6

ng/mL,振荡混匀,然后按“1.2.3项”处理。以吗啡血浆浓度 C 对峰面积的比值 F(吗啡峰面积/内标峰面积)进行线性回归,得标准曲线方程为 $C=0.9627F-0.0196(r=0.9997,n=8)$ 。吗啡在 1.8~921.6 ng/mL 范围内,线性关系良好,见图 2。当 $S/N \geq 10$ 时,最低定量限为 1.8 ng/mL。

2.3 回收率与精密度的试验 取空白血浆 3 份,分别按“2.2 项”制备 14.4、115.2、460.8 ng/mL 的吗啡血浆对照品溶液,然后按“1.2.3 项”处理。每种浓度日内平行测 5 次,3 种浓度隔日测定 1 次,一共 5 次。分别计算日内、日间精密度,并根据同一天内低、中、高 3 个浓度血浆对照品结果计算相对回收率;另配 14.4、115.2、460.8 ng/mL 对照品溶液,以此为标准,计算吗啡的绝对回收率,结果见表 1。

表 1 血浆中吗啡测定的回收率及精密度(n=5)

加入量 (ng/mL)	日内差异		日间差异		相对回收 率(%)	绝对回收 率(%)
	测得量 (ng/mL)	RSD (%)	测得量 (ng/mL)	RSD (%)		
14.4	14.1±0.29	3.86	13.8±0.38	3.91	95.84	89.31
115.2	112.5±0.45	3.14	116.5±0.58	4.63	101.13	91.25
460.8	453.9±0.92	3.93	451.5±1.52	4.97	97.99	91.83

2.4 冻融稳定性试验 分别按“2.2 项”制备低、中、高浓度(14.4、115.2、460.8 ng/mL)的吗啡血浆质控样品若干份,分别在室温放置 0、2、4、6、12 h,反复冻融 0、1、2、3、4 次,于 -20℃ 冰箱保存 0、5、10、20 d 后,按“1.2.3 项”处理,进行样品的色谱测定。含量变化的 RSD 为 8.95%,表明吗啡在血浆中至少放置 20 d 稳定。

2.5 患者血样含量测定 取患者上肢静脉血 5 mL,离心分取血浆,按“2.2 项”平行处理 3 份,避光低温保存至测定。RP-HPLC 法测定血浆中吗啡的含量,重现性比较好,结果见表 2。

表 2 患者血样的测定结果(n=3,ng/mL)

编号	浓度 1	浓度 2	浓度 3	平均浓度	RSD(%)
Morphine-1	15.1	15.8	14.6	15.2	3.98
Morphine-2	43.8	42.5	44.3	43.6	2.14
Morphine-3	28.3	29.6	27.1	28.4	4.42

3 讨论

吗啡为两性物质,调整 pH 值至中性可显著改变峰形,提高灵敏度。吗啡在波长 212 nm 和 233 nm 处均有较大吸收,但在 212 nm 处扫描时发现基线稳定性差且内源性物质干扰较大,故选择 233 nm 作为检测波长。

样品预处理是检测的关键步骤之一,国外报道吗啡的提取多为固相萃取法^[1-3],虽然固相萃取能排除内源性杂质峰的干扰,但成本较高,国内尚未普遍应用,本文参考文献^[4-6],采用有机溶剂提取法,提取时损失较小,回收率达到 89% 以上,提取量与吗啡的浓度之间线性关系良好,而且操作简便、快速,适合大样本的检测。

近年来,国内外测定人体内吗啡含量的方法主要有液质联谱法(LC-MS-MS)^[7-8]、气质联谱法(GC-MS)^[9]、超高效液相色谱法(SPE-UPLC)^[10]、电泳法^[11]、化学发光分析法^[12]、反相离子对高效液相色谱法^[13]等,这些方法不同程度地存在分析仪器普及率低、样品前处理复杂、特异性差、分析时间长等缺点,并不适合基层临床研究的推广。本文建立的 RP-HPLC 法与

陈利琴等^[14]报道相比,选用了较长的分离色谱柱,在较低流速的情况下实现了很好的分离,有效保护了色谱柱及高压泵系统的使用寿命,利于样品大批量连续分析。总之,该方法既避免了体内代谢产物的干扰,又可使保留时间适中,减少了工作量。具有前处理简单、分析仪器普及率高、简便、快速、准确、灵敏度高等优点,适用于吗啡的临床研究和不良反应监测。

参考文献:

- [1] Dale W, Evan DK. Determination of morphine and morphine glucuronides in human plasma by 96-well plate solid phase extraction and liquid chromatography electro-spray ionization mass spectrometry [J]. J Chromatography B, 2003,796:95-103.
- [2] Ary K, Rona K. LC determination of morphine and morphine glucuronides in human plasma by coulometric and UV detection [J]. J Pharm Biom Anal, 2001,26:179-187.
- [3] Baker L, Ratka A. Sex-specific differences in levels of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine antinociception in rats [J]. Pain, 2002,95:65-74.
- [4] 胡四平,李玉红. 高效液相色谱法测定异丙酚血浆药物浓度 [J]. 重庆医学, 2006,35(24):2248-2250.
- [5] 黄洪勇,职晓燕,钱东丽,等. 互为内标法测定人体血浆中米氮平与氯氮平的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2010,30(7):577-579.
- [6] 刘明,张梦军,张莉,等. 反相离子对 HPLC 测定人血浆中二甲双胍研究 [J]. 重庆医学, 2008,37(19):2209-2210.
- [7] Ristimaa J, Gergov M, Pelander A, et al. Broad-spectrum drug screening of meconium by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry [J]. Anal Bioana Chem, 2010,398(2):925-935.
- [8] 罗奇志,马安德,戴开金. 高效液相色谱-串联四极杆质谱联用测定人全血中吗啡含量 [J]. 南方医科大学学报, 2009,29(2):365-366.
- [9] 董镗,尉志文,负克明,等. 生物样品中吗啡 GC 和 GC/MS 测定方法 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010,20(4):697-699.
- [10] 张小婷,孙立敏,刘娟,等. SPE/UPLC 法检测血中吗啡、苯丙胺类及氯胺酮 [J]. 中国法医学杂志, 2011,26(1):16-18.
- [11] Zhang QL, Li XY, Lian HZ. Determination of morphine and codeine in urine using poly(dimethylsiloxane) microchip electrophoresis with electrochemical detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007,43(1):237-242.
- [12] 李世君,杨冉,屈凌波,等. 鲁米诺-高碘酸钾化学发光法测定盐酸阿朴吗啡 [J]. 药物分析杂志, 2011,31(7):1376-1378.
- [13] 贺瑞英,刘丽京,邓艳萍. 反相离子对高效液相色谱法测定血浆吗啡及其代谢物 M3G 的含量 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2006,15(4):272-276.
- [14] 陈利琴,康学军,李琦,等. RP-HPLC 法测定人全血中吗啡血药浓度 [J]. 药物分析杂志, 2006,26(10):1426-1429.