

[论著]

高效液相色谱法测定海洛因依赖者尿液中的吗啡^{*}

张 枫 孙 莉 刘丽京 邓艳萍^{**}

(北京大学中国药物依赖性研究所, 北京, 100083)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定海洛因依赖者尿液中的吗啡浓度。方法: 尿样经酸水解后用乙酸乙酯提取, 然后采用 HPLC 分析。仪器条件: Diamonsil(tm) 钻石 C₁₈ 色谱柱, 流动相 0.012 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 - 乙腈 (90:10, 含 0.05 mmol·L⁻¹ 三乙胺), 流速 1.0 ml·min⁻¹, 检测波长 205 nm。结果: 吗啡和内标与内源性杂质分离良好; 在 0.050 - 2.000 μg·ml⁻¹ 浓度范围线性关系良好 (r = 0.9999); 检测限为 0.020 μg·ml⁻¹; 高、中、低 3 种浓度相对回收率为 95.3% - 104.6%, 日内变异 (RSD) 为 4.0% - 8.1%, 日间变异为 1.9% - 10.7%。结论: 本法简便、准确, 可用于测定海洛因依赖者尿液中的吗啡浓度。

关键词 高效液相色谱; 海洛因; 吗啡; 尿液

DETERMINATION OF MORPHINE IN THE URINE OF HEROIN ABUSERS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ZHANG Feng, SUN Li, LIU Lijing, DENG Yanping

(National Institute on Drug Dependence, Peking University, Beijing, 100083)

ABSTRACT *Objective:* To develop a high performance liquid chromatographic method with UV detection for the determination of morphine in the urine of heroin abusers. *Methods:* Morphine was extracted from the urine by ethyl acetate one step extraction method after acid hydrolysis, then determined by HPLC with Diamonsil(tm) C₁₈ column. The mobile phase consisted of 0.012 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ - acetonitrile (90:10) containing 0.5 mmol·L⁻¹ triethylamine. The flow - rate was 1.0 ml·min⁻¹, and the wavelength of UV detection was 205 nm. *Results:* Morphine and internal standard could be separated from endogenous compounds. Linearity was verified from 0.050 - 2.000 μg·ml⁻¹ (r = 0.9999) and the limit of quantitation (LOQ) was 0.020 μg·ml⁻¹. The relative recovery of morphine at three different concentration levels ranged from 95.3 % to 104.6%; the RSD value of within - day was 4.0% - 8.1% and the value of between - day was 1.9% - 10.7%, respectively. *Conclusion:* The method can quantify morphine in the urine of heroin abusers rapidly and accurately.

KEY WORDS HPLC; heroin; morphine; urine

海洛因 (heroin) 为吗啡的二乙酰衍生物, 在体内代谢迅速, 半衰期约为 2.0 min^[1], 脱去一个乙酰基后代谢为单乙酰吗啡 (6 - MAM), 后者的半衰期约为 0.5 h^[2], 很快水解为吗啡, 进而生成葡萄糖醛酸吗啡。因此, 吸食海洛因后, 从尿液中排出的有单乙酰吗啡、吗啡及葡萄糖醛酸吗啡等物质。在酸性条件下, 葡萄糖醛酸吗啡和单乙酰吗啡均可水解为吗

啡, 所以在处理尿样时常采用酸水解法^[3]。测定海洛因依赖者尿样中的总吗啡含量, 为监测体内毒品排泄情况建立基本的方法。

国内外有关尿吗啡检测的主要方法有气相色谱 - 质谱联机测定法 (GC - MS)^[4], 该方法灵敏度高、精确、可靠, 但设备昂贵、操作繁琐。相关研究中还常使用薄层色谱法 (TLC)^[5], 此法定性比较准确, 但定量较差。放射免疫 / 酶测定法 (RIA / DPC) 是近几年开发的一种极为简便快速的定性、半定量检测法, 但特异性较差, 主要适用于快速筛查。高效液相色谱法具有简便、适用范围广的特点, 它专一性强、定量

^{*} 受国家重点基础研究项目资助 (项目编号: 2003CB515400)

^{**} 通讯作者: E - mail: deng311@bjmu.edu.cn;

Tel: 82802462

准确,虽然灵敏度不及 GC-MS 法,但完全可以满足海洛因依赖者尿液吗啡定量的需要。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器

硫酸吗啡标准品,由青海制药厂提供(批号:930915)。间乙酰氨基酚标准品由上海新中化工厂提供(批号:1650324)。乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。

Agilent HPLC-UV 1100 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司制造,由 Agilent 1100 系列四元泵、柱温箱、真空脱气机、多波长检测器、色谱工作站组成;TDL-5-A 型离心机,上海安亭科学仪器厂制造;XW-80A 旋涡混合器,海门麒麟医用仪器厂制造。

1.2 色谱条件

色谱柱:Diamondsil(tm)(钻石) C_{18} 色谱柱,迪马公司产品(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m);流动相:0.012 mol·L⁻¹磷酸二氢钾-乙腈(90:10,含 0.05 mmol·L⁻¹三乙胺);流速:1.0 ml·min⁻¹;柱温:25℃;UV 检测波长:205 nm。

1.3 尿液样本的提取

取尿液样本 1 ml 于 10 ml 离心管中,加入 100 μ l 浓盐酸,于沸水中水解 30 min。冷却后以 40% NaOH 溶液调节 pH 值至 9 左右,加入浓度 10 μ g·ml⁻¹的间乙酰氨基酚 0.05 ml 作为内标,混匀。加入 0.5 ml 碳酸盐缓冲液(pH=9),混匀。然后加入乙酸乙酯 3 ml 提取,旋涡混合 1 min,3000 r·min⁻¹离心 10 min,取上层有机相,于 60℃ 水浴,氮气吹干。残留物用 50 μ l 双蒸水溶解,进样 20 μ l, HPLC 分析。

1.4 标准曲线制备

在空白尿液中加入适量吗啡标准工作液,使其形成浓度为 0.050、0.100、0.250、0.500、1.000 和 2.000 μ g·ml⁻¹的标准尿液样本(每个浓度样本 2 份),按上述方法提取、检测。以吗啡浓度为横坐标,吗啡与内标峰面积比为纵坐标,进行线性回归,制作标准曲线。

1.5 准确度和精密度考察

在空白尿液中加入适量吗啡标准工作液,配制浓度为 0.050、0.500 和 2.000 μ g·ml⁻¹的质控尿液样本,按上述方法提取和检测,进行方法回收率和精密度试验。日内精密度是在同一日内将上述 3 个浓度的质控样本重复测定 6 次,计算实测浓度的相对标准差(RSD)。日间精密度为各浓度样本在不同日期重复测定 6 次,同样以实测浓度的相对标准差表示。质控样本实测浓度与真实浓度的比值即为相对回收率。

1.6 提取回收率

在空白尿样中加入一定量的吗啡标准溶液,配制浓度为 0.100、0.500 和 2.000 μ g·ml⁻¹的吗啡尿液样本(每个浓度样本 6 份),按上述方法提取和检测,记录峰面积。在同样条件下检测相应浓度的吗啡标准溶液。以相应的峰面积比值计算提取回收率。

1.7 稳定性考察

配制一定浓度的吗啡尿样在 -20℃ 冰箱中冷冻 3 个月。室温放置解冻后,取 1 ml 尿样按上述方法检测吗啡浓度。

2 结果

2.1 专属性

图 1 分别为空白尿液、含吗啡标准品的尿液和海洛因依赖者尿液样本的色谱图。由图 1 可见,吗啡和内标与尿液中内源性物质和代谢产物分离良好,保留时间分别是 5.9 min 和 16.0 min。

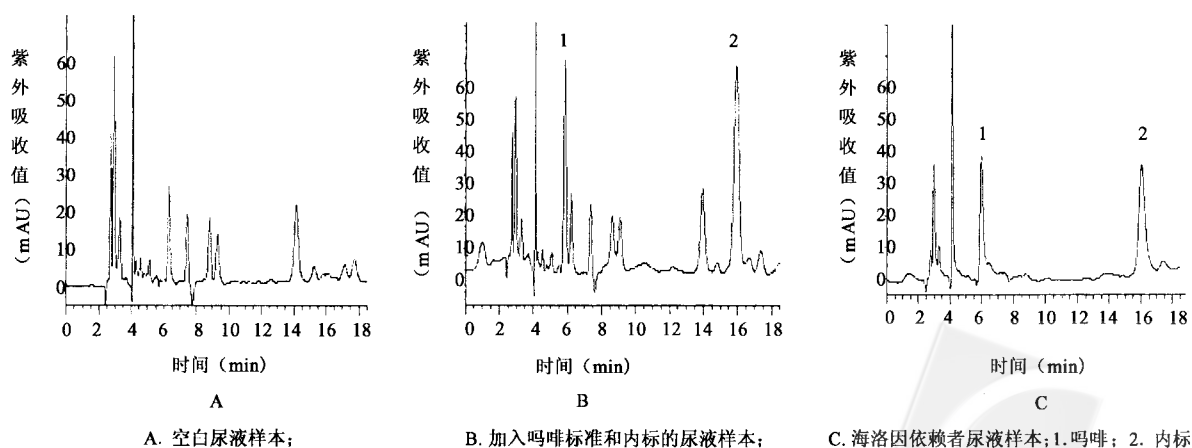


图 1 吗啡尿液样本的 HPLC 色谱图

2.2 标准曲线

以吗啡浓度为横坐标,吗啡与内标峰面积比值为纵坐标,绘制标准曲线见图 2。标准曲线的回归方程为 $Y = 0.4321X + 0.0032$ ($r = 0.9999$)。可见,吗啡浓度在 $0.050 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} - 2.000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 范围内线性关系良好。按信噪比大于 3:1 确定检测限,最低检出浓度为 $0.020 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

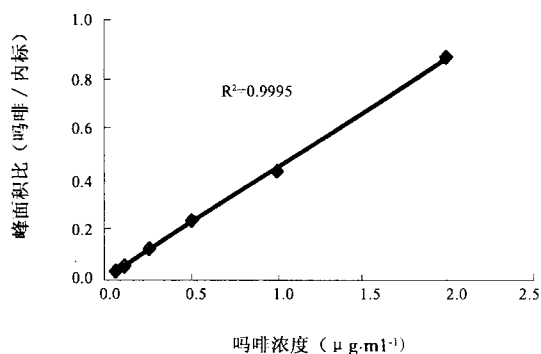


图 2 吗啡标准曲线

2.3 准确度和精密度

此检测方法的准确度和精密度考察结果见表 1 和表 2。

表 1 日内精密度和相对回收率 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

| 加入量 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) | 实测值 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) | 回收率 (%) | RSD (%) |
|---|---|------------|------------|
| 0.050 | $0.048 \pm s 0.003$ | 95.3 | 6.5 |
| 0.500 | $0.523 \pm s 0.021$ | 104.6 | 4.0 |
| 2.000 | $1.985 \pm s 0.161$ | 99.2 | 8.1 |

表 2 日间精密度和相对回收率 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

| 加入量 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) | 实测值 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) | 回收率 (%) | RSD (%) |
|---|---|------------|------------|
| 0.050 | $0.050 \pm s 0.005$ | 100.5 | 10.7 |
| 0.500 | $0.501 \pm s 0.022$ | 100.2 | 4.5 |
| 2.000 | $1.984 \pm s 0.038$ | 99.2 | 1.9 |

2.4 提取回收率

吗啡尿液样本的提取回收率在 73% - 77% 之间,见表 3。

2.5 稳定性

配制浓度为 $0.500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的吗啡尿样,实测浓度为 $0.516 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,检测结果在变异允许范围内,

提示尿样在 -20°C 条件下可保持稳定。

2.6 方法应用

取某海洛因依赖者的尿样,按上述方法测定吗啡浓度。距末次吸毒 17 h 的尿液中吗啡浓度为 $21.268 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,24 h 后尿液中吗啡浓度为 $6.579 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

表 3 吗啡尿样的提取回收率 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

| 加入量 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) | 样本峰面积 (mAU * S) | 标准品峰面积 (mAU * S) | 峰面积比 (%) |
|---|---------------------|---------------------|-------------|
| 0.100 | $70.3 \pm s 6.2$ | 95.8 | 73.4 |
| 0.500 | $291.5 \pm s 13.5$ | 378.57 | 77.0 |
| 2.000 | $1143.9 \pm s 52.9$ | 1520.3 | 75.2 |

3 讨论

吗啡呈弱碱性, pKa 值是 7.9, 在生理 pH 条件下, 76% 的分子是解离型的, 较易溶于水而脂溶性低。因此在使用乙酸乙酯提取尿样的过程中, 调节 pH 值对提取效率有重要影响。经多次试验发现, 酸水解后的尿样当其 pH 值调至 9.0 左右时, 提取效率最高。

海洛因依赖者在脱毒过程中, 尿液吗啡浓度随时间推移经历了由高转低的过程。国内一项研究^[6]利用胶体金免疫试剂盒快速定性检测尿液中的吗啡, 对 87 例海洛因依赖者尿检转阴时间进行监测追踪, 发现距末次吸毒 72 - 96 h 的尿液吗啡浓度下降至尿检试剂盒 CUTOFF 值 $300 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (尿检试剂盒的灵敏度) 以下。这提示在海洛因依赖者脱毒治疗前 4 d 的尿样检测工作中, 应根据尿样采集时间对其进行适当的稀释。在本次检测中, 预先将距末次吸毒 17 h 的尿样稀释了 20 倍, 使其浓度在线性范围内。

国外文献报道的尿液吗啡提取方法多为固相萃取法^[2, 3], 成本较高。而国内多采用氯仿、异丙醇等有机溶剂多步骤提取^[7], 操作复杂。本方法采用酸水解法, 使海洛因依赖者尿液中的单乙酰吗啡和葡萄糖醛酸的吗啡均水解为吗啡。通过优化色谱条件, 使用常用试剂乙酸乙酯一步提取尿液中的吗啡, 简化操作步骤, 降低检测成本, 同时避免毒性试剂对操作人员的危害。此方法适用于大批量的样本检测, 能够满足海洛因依赖者尿样检测的要求。

4 参考文献

- 1 Umans JG, Chiu TSK, Lipman RA, et al. Determination of heroin and its metabolites by high performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1982, 233: 213 - 225
- 2 Meadway C, George S, Braithwaite R. A rapid GC - MS method for the determination of dihydrocodeine, codeine, norcodeine, morphine, normorphine and 6 - MAM in urine [J]. Forensic Sci Int, 2002, 127(1 - 2): 136 - 141
- 3 Mofwa F, Chan KM, Hashimoto Y. Concentrations of morphine and codeine in urine of heroin abusers [J]. Legal Med, 1999, 1: 140 - 144
- 4 Paul BD, Well LD, Mitchell JJM, et al. Simultaneous identification and quantitation of codeine and morphine in urine by GC - MS [J]. J Analyt Toxicol, 1985, (9): 222 - 224
- 5 丁继超, 王耀华, 衡克礼, 等. 薄层色谱法对海洛因依赖者尿检三种显色方法灵敏度的实验研究 [J]. 中国药物滥用防治杂志, 2000, 3: 10 - 11
- 6 陈雪琴. 海洛因依赖者尿检转阴时间监测探讨 [J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(7): 867 - 868
- 7 赵华, 李惠芝, 邱宗荫. 高效液相色谱法测定尿中海洛因代谢物 [J]. 重庆医科大学学报, 1996, 21: 326 - 329

收稿日期: 2005 - 02 - 23 修回日期: 2005 - 04 - 20