

液相色谱-串联质谱法测定比格犬血浆中氢吗啡酮

李小燕¹, 陈笑艳¹, 严青英², 张志宏², 徐静华¹, 金鑫¹, 钟大放^{1*}

(1. 沈阳药科大学 药物代谢与药物动力学实验室, 辽宁 沈阳 110016; 2. 青海制药厂有限公司, 青海 西宁 810003)

摘要: 目的 建立快速、灵敏的液相色谱-串联质谱法测定比格犬血浆中氢吗啡酮。方法 比格犬血浆 0.1 mL 经 β 葡萄糖苷酶孵化 16 h 后, 采用液-液萃取法处理, 以甲醇-水-甲酸(65351)为流动相, Zorbax SB C₈ 柱分离, 采用大气压化学电离源, 选择反应监测(SRM)。结果 测定氢吗啡酮的线性范围为 0.80 - 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 定量下限为 0.80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。日内、日间精密度(RSD)均小于 6.0%, 准确度(RE)在 $\pm 1\%$ 以内。应用此法研究了 6 只比格犬单剂量 *po* 盐酸氢吗啡酮缓释片 4 mg 后的药代动力学特征。结论 该法选择性强、灵敏度高, 适用于氢吗啡酮缓释制剂的药代动力学研究。

关键词: 氢吗啡酮; 液相色谱-串联质谱法; 血浆药物浓度

中图分类号: R917.1; TQ460.72 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)11-0929-04

Determination of hydromorphone in Beagle dogs plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Xiao-yan¹, CHEN Xiao-yan¹, YAN Qing-ying², ZHANG Zhi-hong², XU Jing-hua¹, JIN Xin¹, ZHONG Da-fang¹

(1. Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Qinghai Pharmaceutical Plant Ltd., Xining 810003, China)

Abstract: **Aim** To establish a LC/MS/MS method for determination of hydromorphone (HYD) in Beagle dog plasma. **Methods** After incubation with β glucuronidase for 16 h, an aliquot of 0.1 mL plasma was treated by liquid-liquid extraction. The analytes of interest were separated on a Zorbax SB C₈ column with the mobile phase consisting of methanol-water formic acid (65351). Atmospheric pressure chemical ionization source of MS was applied and operated in positive ion mode. **Results** The linear calibration curve was obtained in the concentration range of 0.80 - 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The lower limit of quantification was 0.80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The inter-day and intra-day precision (RSD) was below 6.0%, and the accuracy (RE) was within 1% calculated from QC samples. The method was used to determine the pharmacokinetic parameters of HYD after a single oral administration of 4 mg HYD sustained release tablets to Beagle dogs. **Conclusion** The method was proved to be specific, sensitive, and suitable for the pharmacokinetic study of HYD sustained release formulation.

Key words: hydromorphone; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; plasma concentration

氢吗啡酮(hydromorphone, HYD)为半合成的强镇痛药,其结构与吗啡类似,而镇痛作用大约是吗啡

的 8 倍,副作用较吗啡轻,临床主要用于缓解癌症、术后、软组织创伤等引起的中强度疼痛。HYD 在体内发生广泛的结合代谢, HYD-3-O-葡萄糖苷酸是其主要代谢物^[1-3]。HYD 的消除半衰期仅为 2.5 h, 为获得良好镇痛效果, HYD 在临床用药时每隔 4 h 给药 1 次^[4], 为方便患者用药, 延长给药间隔的缓释制剂的

收稿日期: 2004-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39930180)

通讯作者 Tel/ Fax: 86-24-23902539,

E-mail: zhongdf@china.com

研制引起国内外学者的关注。

HYD 血浆样品测定方法主要有放射免疫法^[3,5]、高效液相色谱法^[6,7]和液相色谱-质谱联用法^[8,9]。本实验旨在建立一种快速、灵敏的液相色谱-串联质谱法测定比格犬给予 HYD 缓释制剂后血浆中 HYD 的浓度,以评价其缓释特征。

材料与方法

仪器 美国 Finnigan 公司 TSQ 型液相色谱-串联质谱联用仪,配有大气压化学电离源 (APCI) 以及 Xcalibur 1.1 数据处理系统;日本岛津公司 LC-10ADvp 液相色谱输液泵;美国 Zymark 公司 TurboVap 蒸发仪。

药品与试剂 盐酸氢吗啡酮对照品 (99.8%) 由青海制药有限公司提供;盐酸特拉唑嗪对照品 (99.8%) 由广州贝氏药业有限公司提供;受试制剂盐酸氢吗啡酮缓释片 (规格:4 mg/片) 由青海制药厂有限公司研制;参比制剂盐酸氢吗啡酮片 (规格:4 mg/片) 由美国 Mallinckrodt Inc. 生产;甲醇为色谱纯,购于天津市康科德科技有限公司;β-葡萄糖苷酸酶 (542 200 u·g⁻¹) 购自美国 Sigma 公司。

色谱条件 Zorbax SB C₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm, 美国安捷伦公司);流动相为甲醇-水-甲酸 (65351);流速 0.55 mL·min⁻¹,柱温 20 °C。

质谱条件 离子源为大气压化学电离源 (APCI),加热毛细管温度 250 °C,气化室温度 450 °C;鞘气 (N₂) 压力 600 kPa;辅助气 (N₂) 流量 3 L·min⁻¹;碰撞气 (Ar) 压力 1.9 Pa;碰撞诱导解离 (CID) 电压分别为 35 eV (氢吗啡酮) 和 30 eV (特拉唑嗪);正离子方式检测;扫描方式为选择反应监测 (SRM)。用于定量分析的离子反应分别为 *m/z* 286 → 185 (氢吗啡酮) 和 *m/z* 388 → 290 (特拉唑嗪),扫描时间为 0.3 s。

血浆样品处理 取血浆样品 0.1 mL,加水 100 μL 和内标 (125 μg·L⁻¹ 特拉唑嗪水溶液 100 μL),混匀,加入 β-葡萄糖苷酸酶 (500 ku·L⁻¹, 以 50 mmol NH₄H₂PO₄ 缓冲液配制, pH 5) 200 μL,40 °C 水浴温孵 16 h,冷却,加入饱和 Na₂CO₃ 溶液 500 μL 混匀,用二氯甲烷-异丙醇 (9:1) 3 mL 提取。涡流混合 1 min,往复振荡 15 min,离心 5 min (3 500 r·min⁻¹),分取有机相 2 mL,于 40 °C 空气流下吹干,残留物加流动相 100 μL 溶解,取 20 μL 进行分析测定。

结果

1 质谱分析

氢吗啡酮与内标特拉唑嗪在 APCI 离子化方式下,主要生成 [M + H]⁺ 准分子离子峰,分别为 *m/z* 286 和 *m/z* 388。选择性对准分子离子峰 [M + H]⁺ 进行二级质谱分析 (图 1),氢吗啡酮与内标生成的主要碎片离子分别为 *m/z* 185 和 *m/z* 290,并将其作为定量分析时监测的产物离子。

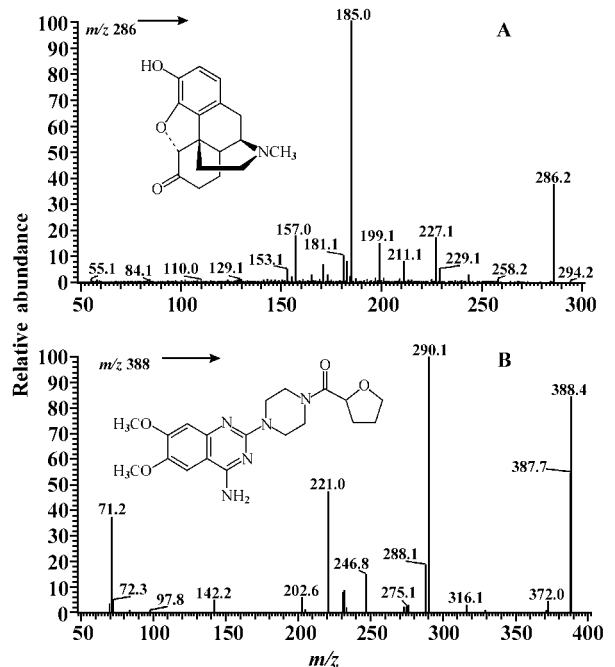


Figure 1 Product ion mass spectra of [M + H]⁺ of hydromorphone (A) and terazosin (B, IS)

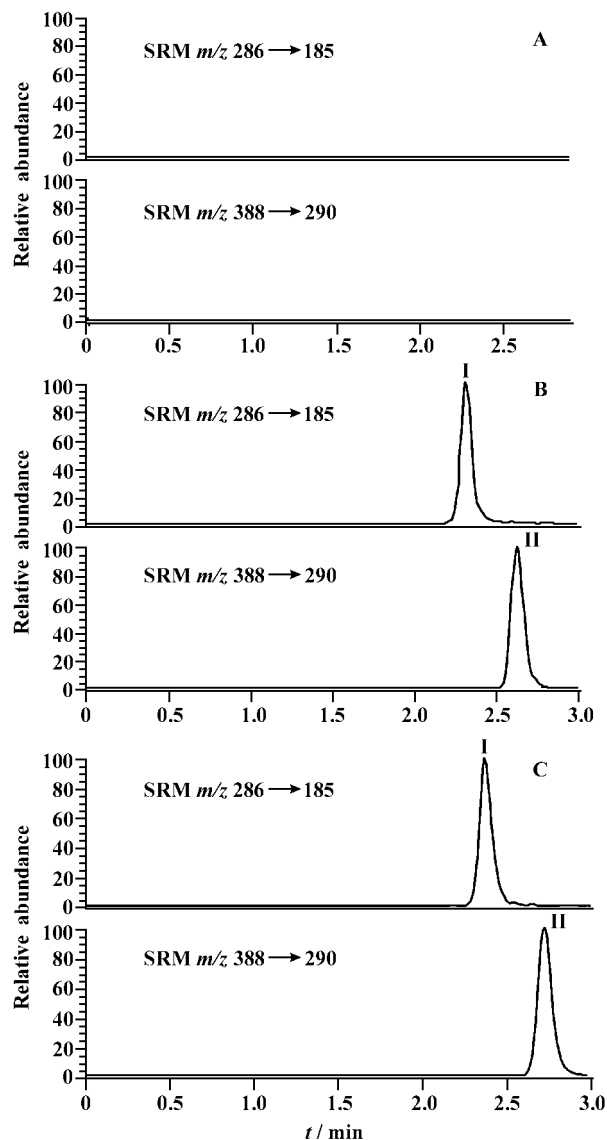
2 方法的专属性

分别取 6 只犬的空白血浆 0.1 mL,除不加内标外,按“血浆样品处理”项下操作,进样 20 μL,得色谱图 2A;将一定浓度的氢吗啡酮标准溶液和内标溶液加入空白血浆中,依同法操作,得色谱图 2B。待测物氢吗啡酮与内标特拉唑嗪的保留时间分别为 2.3 min 和 2.6 min;取比格犬给药后的血浆样品,依同法操作,得色谱图 2C。结果表明,空白血浆中内源性物质不干扰待测物氢吗啡酮及内标物的测定。

3 标准曲线和线性范围

取空白血浆 0.1 mL,加氢吗啡酮系列溶液 100 μL,配制成相当于氢吗啡酮血浆质量浓度为 0.80, 3.0, 10.0, 40.0, 100.0 和 200.0 μg·L⁻¹ 的血浆样品,除不加入流动相 100 μL 外,按“血浆样品处理”项下依法操作,进样 20 μL,记录色谱图;以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权 (1/C²) 最小二乘法进行回归运算^[10],求得的直线回归方程即为标准曲线。氢吗啡酮的典型回归方程为: $Y = 4.44 \times 10^{-4} + 4.51 \times 10^{-3} C, r = 0.9987$ 。

根据标准曲线,氢吗啡酮的线性范围为 0.80 - 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,定量下限为 0.80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



A: Blank plasma sample; B: Plasma spiked with hydromorphone 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and IS; C: Plasma sample 6.0 h after oral administration of 4 mg hydromorphone to a Beagle dog. Peaks I and II refer to hydromorphone and IS, respectively

Figure 2 Typical chromatograms of hydromorphone and IS in Beagle dogs plasma by selected reaction monitoring (SRM) scan mode

4 精密度与准确度

取空白血浆 0.1 mL,按“标准曲线”项下方法制备氢吗啡酮低、中、高 3 个浓度(氢吗啡酮分别为 0.80,10.0 和 180.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的质量控制(QC)样品,每一浓度进行 6 样本分析,连续测定 3 d,并与标准曲线同时进行。以当天的标准曲线计算 QC 样品的浓度,将 QC 样品的结果进行方差分析,求算本法的准确度与精密度,结果见表 1。实验数据表明,日

内、日间精密度(RSD)均小于 6.0%,准确度(RE)在 $\pm 1.0\%$ 以内。

Table 1 Precision and accuracy for the analysis of hydromorphone in Beagle dogs plasma

Concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Added	Found	RSD / %		Relative error / %
			Within-run	Between-run	
0.80	0.81	5.2	5.3	1.0	
10.0	9.99	4.3	2.6	-0.1	
180.0	179.7	4.2	3.4	-0.2	

5 提取回收率和稳定性考察

提取回收率考察时,血浆样品未经孵化处理。取空白血浆 0.1 mL,按“标准曲线”项下的方法制备低、中、高 3 个浓度(氢吗啡酮分别为 0.80,10.0 和 180.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的样品,每个浓度测定 6 个样品。同时另取空白血浆 0.1 mL,按“血浆样品处理”项下提取,残留物以相应浓度的标准溶液溶解,进样分析,获得相应峰面积。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。结果表明,氢吗啡酮血浆浓度在 0.80,10.0 和 180.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的提取回收率分别为 53.9%,53.5%和 54.0%,内标溶液经同法提取处理,其回收率为 62.7%。

本文考察了氢吗啡酮血浆样品在室温放置及 40 $^{\circ}\text{C}$ 孵化时的稳定性。取低、中、高 3 个浓度(氢吗啡酮分别为 0.80,10.0 和 180.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的血浆样品,室温放置 2 h 后,经液-液萃取处理,待测物血浆浓度的相对偏差(RE)在 $\pm 6.1\%$ 之内;3 个浓度的血浆样品在 40 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 16 h,经液-液萃取处理,氢吗啡酮血浆浓度的相对偏差(RE)在 $\pm 8.0\%$ 之内。

此外,本文还考察了内标特拉唑嗪在 40 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 16 h 的稳定性,结果表明特拉唑嗪分解 30% 以上,为保证处理过程的一致性,标准曲线的制备也经孵化处理。

6 分析方法在药动学研究中的应用

采用随机双交叉试验设计,6 只比格犬(♀♂各半,平均体重为 13.4 kg)禁食 12 h 后,单剂量 po 盐酸氢吗啡酮缓释片(受试制剂)和盐酸氢吗啡酮片(参比制剂)各 4 mg 后,于服药前(0 h)和服药后 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,6.0,8.0,12.0,24.0 和 36.0 h 取后腿小隐静脉血 1 mL,离心(4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min,分离血浆。应用本文的分析方法,分别测定血浆样品中的氢吗啡酮浓度,获得血药浓度-时间曲线,见图 3。

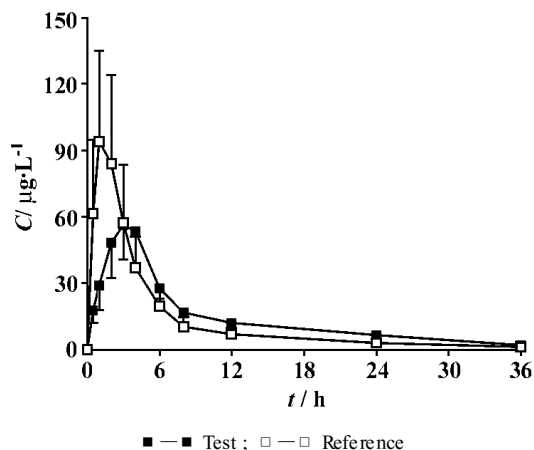


Figure 3 Mean plasma concentration (C)-time (t) curve of hydromorphone after a single oral administration of 4 mg hydromorphone test and reference tablets to 6 Beagle dogs ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

结果可见,受试制剂与参比制剂的达峰时间 T_{max} 分别为 2.8 h 和 1.3 h,峰浓度 C_{max} 分别为 $60.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。受试制剂的 C_{max} 低于参比制剂,而 T_{max} 大于参比制剂,显示该受试制剂具缓释特征。根据血药浓度-时间曲线进行参数计算,以半对数作图法,由消除相的末 4 个浓度点计算 $T_{1/2}$ 。受试制剂与参比制剂的 $T_{1/2}$ 分别为 10.2 h 和 9.7 h。

讨论

口服 HYD 后,首过代谢程度很高,主要生成 3-O-葡糖苷酸结合物^[2,3]。目前测定血浆中 HYD 的文献方法主要为放射免疫法^[3,5],高效液相色谱法^[6,7]和液相色谱-质谱联用法^[8,9]。其中 LC/MS 法使用 ESI 源,正相色谱分离,1 mL 血浆,8 mL 提取溶剂,最低定量限可达 $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[9]。在实验初期,作者曾尝试采用 ESI 源测定犬血浆中 HYD,使用 0.1 mL 血浆,定量下限为 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但测定犬 *po* 盐酸氢吗啡酮片 4 mg 后的血浆样品时发现,药物浓度峰值低于 $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,仅能检测到给药后 8 h 的药物浓度。因此为更好地评价制剂的缓释特征,本实验采用酶水解法测定血浆中游离及结合型 HYD 的总量,该法可以检测到给药后 36 h 的血药浓度。另外,实验中发现,采用 APCI 源测定时,定量下限虽为 $0.80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,但已能满足分析方法灵敏

度的要求,而且该法重现性,准确性均优于 ESI 源法,因此本文最终选择 APCI 源。本法可用于评价 HYD 缓释制剂的药动学特征。

References :

- [1] Mahler DL, Forrest WH. Relative analgesic potencies of morphine and hydromorphone in postoperative pain [J]. *Anesthesiology*, 1975, **42**(5): 602 - 607.
- [2] Wright AW, Mather LE, Smith MT. Hydromorphone-3-glucuronide: a more potent neuro-excitant than its structural analogue, morphine-3-glucuronide [J]. *Life Sci*, 2001, **69**(4): 409 - 420.
- [3] Hagen N, Michael P, Thirlwell, *et al.* Steady-state pharmacokinetics of hydromorphone and hydromorphone-3-glucuronide in cancer patients after immediate and controlled-release hydromorphone [J]. *J Clin Pharmacol*, 1995, **35**(1): 37 - 44.
- [4] Lindena G, Arnau H, Liefhold J. Hydromorphone- review of pharmacological properties and therapeutic efficacy with special regard to a controlled release preparation [J]. *Schmerz*, 1998, **12**(3): 195 - 204.
- [5] Lee JW, Pedersen JE, Moravetz TL, *et al.* Sensitive and specific radioimmunoassay for opiates using commercially available materials. I: Methods for the determinations of morphine and hydromorphone [J]. *J Pharm Sci*, 1991, **80**(3): 284 - 288.
- [6] Bouquillon A, Freeman D, Moulin D. Simultaneous solid-phase extraction and chromatographic analysis of morphine and hydromorphone in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogr*, 1992, **577**(2): 354 - 357.
- [7] Wetzelsberger N, Lückner PW, Erking W. High-pressure liquid chromatographic method for the determination of hydromorphone in human plasma with electrochemical detection [J]. *Drug Res*, 1986, **36**(2): 1707 - 1710.
- [8] Zheng M, Mcerlane KM, Ong MC. LC-MS-MS analysis of hydromorphone and hydromorphone metabolites with application to a pharmacokinetic study in the male Sprague-Dawley rat [J]. *Xenobiotica*, 2002, **32**(2): 141 - 151.
- [9] Naidong W, Jiang X, Newland K, *et al.* Development and validation of a sensitive method for hydromorphone in human plasma by normal phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, **23**(4): 697 - 704.
- [10] Zhong DF. Some aspects in establishing standard curves in bioanalyses with the weighted least squares method [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 1996, **16**(5): 343 - 346.