

人尿中度冷丁及代谢产物的 GC/FID 及 GC/MS 分析

胡绪英 刘 锋 罗 毅

(军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

摘要 建立了尿中度冷丁的 GC/FID 定量方法。度冷丁在 0.1~8 $\mu\text{g/ml}$ 尿范围内浓度与峰面积比成良好的线性相关,回归方程为 $Y=0.4995X+0.1201$, $r=0.9996$,最低检测浓度为 20 ng/ml 。该法灵敏、快速、准确。已应用于一例成瘾患者尿中度冷丁的定量测定。并通过 GC/MS 检测了尿样中度冷丁的主要代谢产物——去甲基度冷丁、去甲基度冷丁酸及其结合物、度冷丁酸及其结合物以及未见文献报道的乙酰基去甲基度冷丁。

关键词 度冷丁; 代谢产物; 气相色谱/氢火焰检测器; 气相色谱/质谱

度冷丁(meperidine)又名哌替啶,为常见麻醉镇痛剂,在人体内经 *N*-去甲基和水解被代谢,并以原形和代谢产物排出体外⁽¹⁾。

度冷丁及代谢产物的分析方法文献报道有 TLC,GC⁽³⁾,HPLC⁽⁴⁾,GC/MS⁽⁵⁾等。本文为了配合临床治疗度冷丁成瘾患者检测尿中度冷丁的含量,建立了尿中度冷丁及代谢产物的 GC/FID 及 GC/MS 方法,对成瘾患者尿中度冷丁及代谢产物进行了检测。

实 验 部 分

仪器及条件

美国 P-E 公司 SIGMA 115 型气相色谱仪,FID 检测器,SE-54 键合相毛细管色谱柱(24 $\text{m} \times 0.24 \text{ mm}$),气化室温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;检测器温度为 260 $^{\circ}\text{C}$;柱温为 100 $^{\circ}\text{C} \sim 250^{\circ}\text{C}$,升温速率 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,保持 8 min。高纯氮为载气,流速为 1 ml/min 。

英国 VG 公司 TRIO-1000 型 GC/MS 联用仪,DB-5 毛细管色谱柱(12 $\text{m} \times 0.32 \text{ mm}$),气化室温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;柱温为 80 $^{\circ}\text{C} \sim 250^{\circ}\text{C}$,升温速率 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,离子源温度为 200 $^{\circ}\text{C}$,电子能量 70 eV,高纯氮为载气,柱前压 40 kPa。

试剂

度冷丁标准品(由公安部第二研究所提供),正二十烷(内标物,色谱纯,上海试剂一厂)均配制成 1 mg/ml 标准液置冰箱内。

pH 9.3 缓冲液,1.5 mol/L 碳酸钠—盐酸溶液,其余试剂均为分析纯。

样品制备

提取

1 取尿样 5 ml ,加入 1 mol/L NaOH 溶液 3 滴(pH 9~10),再加入 pH 9.3 缓冲液 1 ml ,用 5 ml 乙醚提取(混合器振荡 10 s),静置后取乙醚层 3 ml ,置于 10 ml 离心管内,水层再用乙醚提取一次,合并乙醚液在氮气流下挥干,残渣以 50 μl 二氯甲烷溶解(A),供 GC/MS 分析;或将残渣以 45 μl 二氯甲烷溶解,并加入内标液 5 μl ,供 GC 定量分析。

2 尿样经乙醚提取后,水层在 55℃减压浓缩至 1 ml,冰冻干燥,加 15 ml 甲醇(含 10%硫酸)在 100℃回流 5 h。55℃减压浓缩至 1 ml,用氨水调节 pH 9~10,用 20 ml 乙醚提取 2 次,乙醚经氮气流挥干,用 0.5 ml 乙醚溶解。

乙酰化

取上述乙醚液 50 μ l,氮气流下挥干,加入乙酰 30 μ l,吡啶 20 μ l,60℃反应 30 min,将过剩的试剂在氮气流下除去,用 0.5 ml 甲醇溶解(B)。

结果与讨论

代谢产物的鉴定

脂溶性代谢产物的鉴定 样品(A)经 GC/MS 分析,由保留时间和质谱特征离子数据,检出度冷丁原型和 2 个主要代谢产物——去甲基度冷丁及乙酰基去甲基度冷丁。它们的总离子流图和质谱图如图 1。色谱保留值和特征离子见表 1。

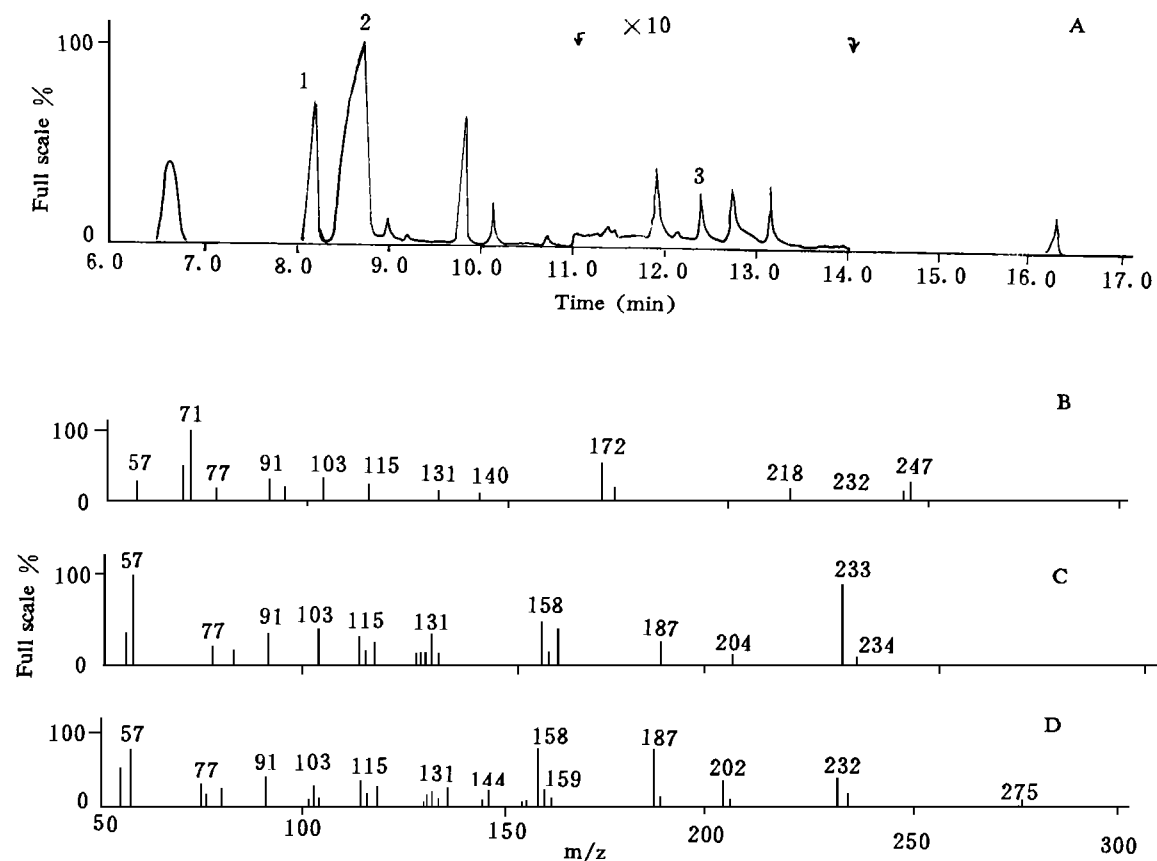
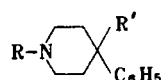


Fig 1 GC/MS chromatogram of ether extract of urine of an addict 14 h after intramuscular injection of 100 mg meperidine. A. TIC chromatogram; B. Mass spectrum of meperidine (peak 1); C. Mass spectrum of normeperidine (peak 2); D. Mass spectrum of acetyl-normeperidine (peak 3).

Tab 1 GC/MS data of meperidine, its metabolites and derivatives



Compound	R	R'	RT(min)	Characteristic ions
Meperidine	CH ₃	COOC ₂ H ₅	8.200	217(M ⁺), 232, 218, 172, 71, 57
Normeperidine	H	COOC ₂ H ₅	8.717	233(M ⁺), 218, 201, 187, 158, 57
Acetyl-normeperidine	COCH ₃	COOC ₂ H ₅	12.384	275(M ⁺), 232, 202, 187, 158, 57
Meperidinic acid and its conjugate (methyl-esterified)	CH ₃	COOCH ₃	7.384	233(M ⁺), 218, 202, 172, 71, 57
Normeperidinic acid and its conjugate (methyl-esterified and acetylated)	COCH ₃	COOCH ₃	11.851	261(M ⁺), 218, 202, 187, 158, 57

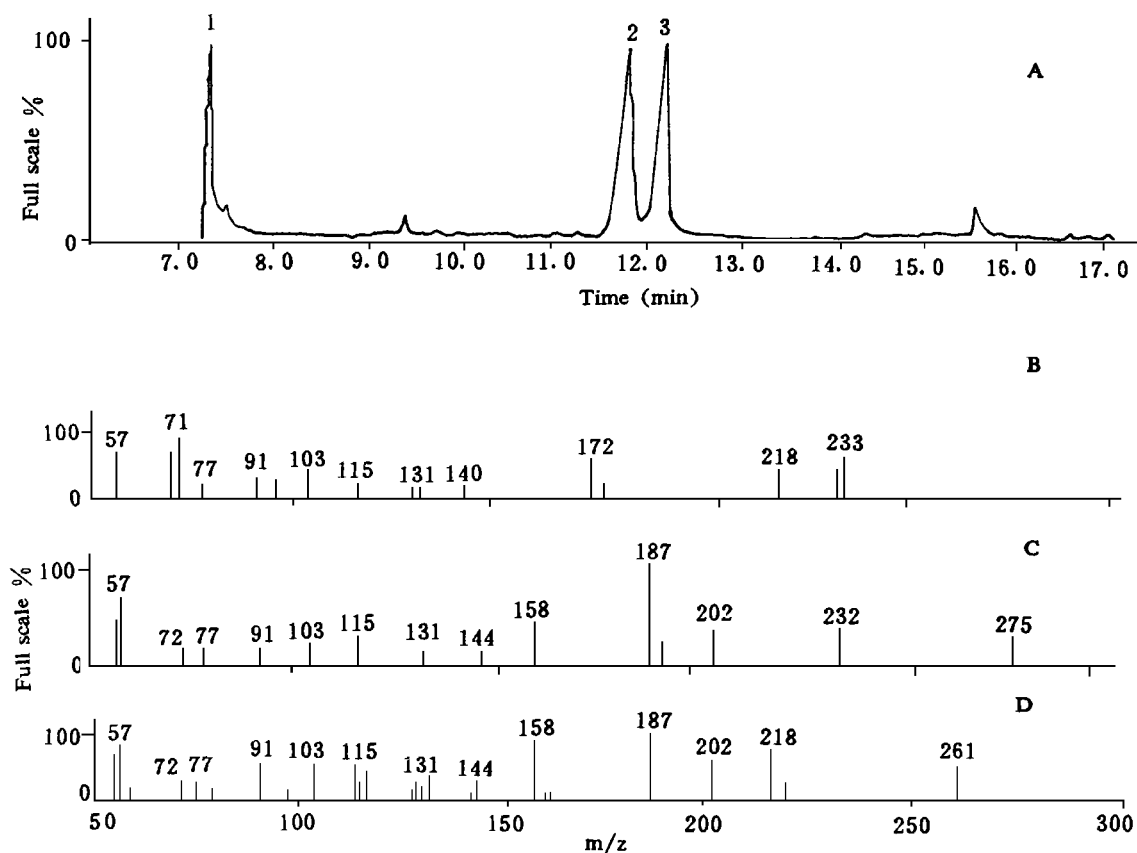


Fig 2 GC/MS Chromatogram of methyl esterified and acetyl metabolites in polar phase of an addict 14 h after intramuscular injection of 100 mg meperidine. A. TIC chromatogram; B. Mass spectrum of methyl-esterified meperidinic acid and its conjugate (peak 1); C. Mass spectrum of acetyl-normeperidine (peak 3); D. Mass spectrum of acetyl-methyl esterified normeperidinic acid and its conjugate (peak 2).

水溶性代谢产物的鉴定 水溶性代谢产物转移到有机相中,文献⁽³⁾应用乙酯化、将度冷丁和去甲基度冷丁酸及其结合物乙酯化,使它们以度冷丁和去甲基度冷丁形式被有机溶剂所萃取。为了有别于因尿样经乙醚提取不完全而残留在水相中的度冷丁及去甲基度冷丁,本实验采用甲酯化,使它们以甲酯化形式被乙醚萃取。

样品(B)经 GC/MS 分析,根据标准品质谱特征离子数据⁽²⁾,在(B)液中检出度冷丁酸及其结合物的甲酯化合物、去甲基度冷丁酸及其结合物甲酯化后乙酰化衍生物和乙酰基去甲基度冷丁。它们的总离子流图和质谱图见图 2。色谱保留值和特征离子见表 1。

由图 1, 2 和表 1 可见,当肌注 100 mg 度冷丁 14 h 后尿中可检出度冷丁原型及其主要代谢产物去甲基度冷丁、乙酰基去甲基度冷丁、度冷丁酸及其结合物、去甲基度冷丁酸及其结合物的存在。而乙酰基去甲基度冷丁作为度冷丁的代谢产物未见文献报道。

由此可推知度冷丁在人体内主要代谢途径和主要代谢物结构式如图 3。

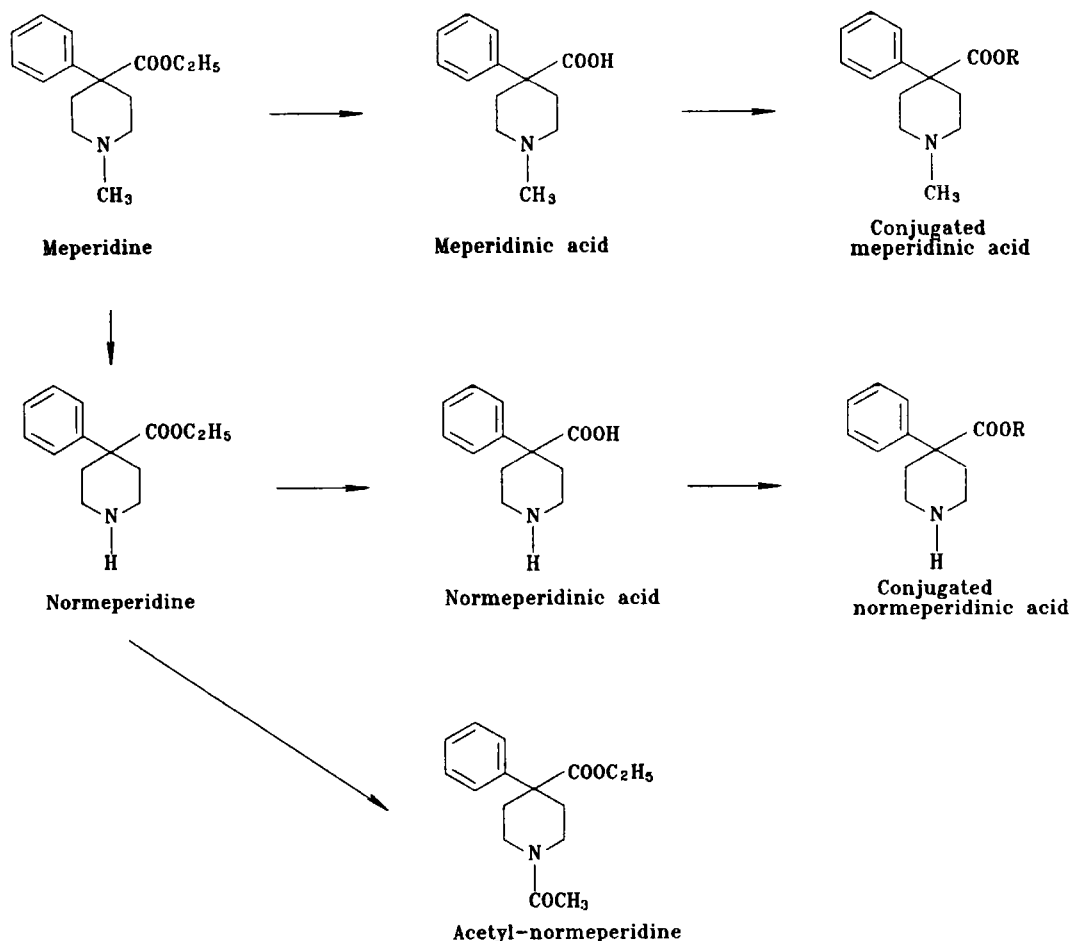


Fig 3 The structures of meperidine and its main metabolites.

尿中度冷丁及去甲基度冷丁的定量分析

标准曲线及检测限

取空白尿 5 ml 若干份,分别加入不同量的度冷丁盐酸盐水溶液,按“样品制备 1”项操作,进行 GC 分析,以度冷丁与内标色谱峰面积比对度冷丁浓度作线性相关,度冷丁在 0.1~8.0 $\mu\text{g/ml}$ 范围内浓度与峰面积成良好线性相关。线性方程为 $Y = 0.4995X + 0.1201$, $r = 0.9996$

($n=6$),最低检测浓度为 20 ng/ml 尿。

回收率及相对标准偏差

取空白尿 5 ml 若干份,分别加入度冷丁盐酸盐,按“样品制备 1”进行分析。当加入量分别为 2.5, 1.0 μg 时,回收率分别为 71.9 ± 0.06 和 $81.1 \pm 0.17\%$ ($n=7$),RSD 分别为 17.6 和 10.7%。

样品分析

成瘾患者肌注 100 mg 度冷丁,不同时间收集尿样,按“样品制备 1”项操作,经 GC/FID 分析(气相色谱图见图 4)。以内标法测定了不同排泄时间尿中度冷丁和去甲基度冷丁的含量,结果见表 2。由表 2 可见 48 h 内尿中度冷丁和去甲基度冷丁的排泄量分别为用药量的 12.2 和 41.7%; 48~72 h 间尿中度冷丁和去甲基度冷丁的排泄量分别为用药量的 0.4 和 2.2%、72 h 尿中度冷丁几乎排尽。

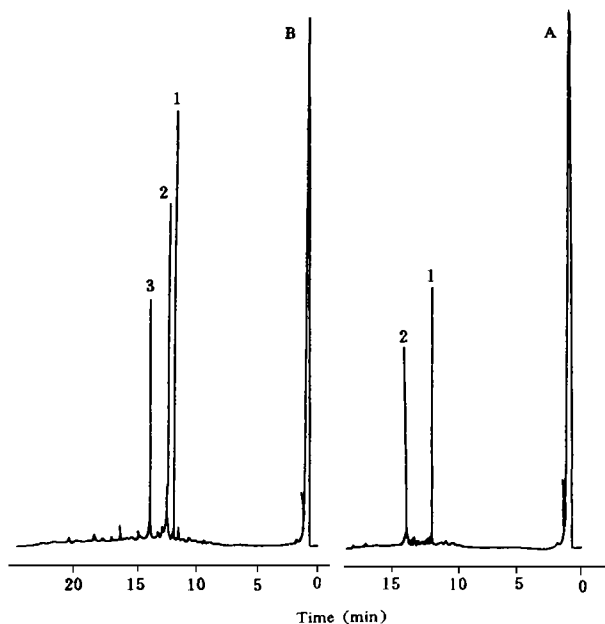


Fig 4 Gas chromatogram of meperidine. A. Chromatogram of blank urine extract spiked with meperidine; B. Chromatogram of urine extract of an addict; 1. Meperidine; 2. Internal standard; 3. Normeperidine.

Tab 2 Amount of meperidine and normeperidine in urine of an addict at different times

Time (h)	Amount of urine (ml)	Meperidine (mg)	Normeperidine (mg)
7.5	200	1.18	7.08
14.0	200	2.35	8.55
24.0	800	3.38	13.86
38.0	600	3.59	9.98
48.0	600	1.67	2.34
62.0	600	0.38	1.90
72.0	600	0.03	0.27

本法操作简便、快速、准确、易于掌握,可用于尿中局麻药的定量分析。

致谢 307 医院内二科王淑范主任提供病例及尿样。

参 考 文 献

- 1 沈克温,等主编. 实用药物分离鉴定手册. 北京:人民军医出版社, 1986 : 820.
- 2 Pfleger K, et al. .Mass spectral and GC data of drugs, poisons and their metabolites. Weinheim; VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1985.
- 3 Yeh SY and Krebs HA. TLC identification and GLC determination of meperidine and its metabolites in biological fluids. *J Pharm Sci* 1981;70 : 482.
- 4 Meatherall RC and Guay DR. Analysis of meperidine and normeperidine in serum and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1985;338 : 141.
- 5 Yeh SY. Metabolism of meperridine in several animal species. *J Pharm Sci* 1984;73 : 1783.

ANALYSIS OF MEPERIDINE AND ITS METABOLITES IN URINE OF AN ADDICT BY GC/FID AND GC/MS

XY Hu, F Liu and Y Luo

(*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*)

ABSTRACT Analytical methods of GC/FID and GC/MS for identification and determination of meperidine, an analgesic drug, and its metabolites were established. The determination of meperidine spiked in urine was shown to have a good linear relationship in the range of 0.1~8.0 $\mu\text{g/ml}$ urine ($Y=0.4995X+0.1201$, $r=0.9996$). The detection limit was 20 ng/ml urine. With the developed methods, meperidine and its metabolites in urine collected from a meperidine addict were identified and determined. Meperidine, normeperidine, meperidinic acid in free and conjugate forms, normeperidine acid in free and conjugate forms, and acetyl-normeperidine were detected. Among these metabolites, acetyl-normeperidine was reported for the first time.

Key words Meperidine; Metabolites; GC/FID; GC/MS