

水和生物体液中曲马多镇痛药的中空纤维膜液相微萃取

王晓飞, 刘俊亭, 王妍, 赵秀丽, 高丽娜, 徐冬辉

(中国医科大学药学院, 辽宁 沈阳 110001)

摘要 :使用中空纤维膜液相微萃取技术(LPME-HFM)建立了从水和生物样品(尿和血浆)中提取曲马多的方法。在室温(20℃)下用聚偏氟乙烯中空纤维膜过滤提取样品。萃取过程中用4 μL 甲苯作为萃取溶剂。用度冷丁作为内标,气相色谱法-氢火焰离子化检测器分析测定,最低检测限达0.01 mg/L(自来水、尿)或0.05 mg/L(血浆)。和传统的液液萃取方法相比,该方法集萃取和浓缩一步完成,更简便、快速、绿色环保。

关键词 :液相微萃取;中空纤维膜;气相色谱;曲马多;度冷丁

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2006)06-0641-04 栏目类别:研究论文

Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction of Tramadol from Water and Biological Samples

WANG Xiaofei, LIU Junting, WANG Yan, ZHAO Xiuli, GAO Lina, XU Donghui

(Pharmaceutical College, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract : A novel technique of liquid phase microextraction supported by hollow fiber membrane (LPME-HFM) was applied to extract tramadol in tap water, urine and human plasma. At room temperature (20 °C), polyvinylidene fluoride hollow fiber membrane (PVDF-HFM) was employed. In the procedure of extraction, 4 μL of organic solvent (toluene) was used in individual extraction. Pethidine was used as the internal standard (IS) in the sample analysis by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). The optimized conditions for tramadol extraction was as follows: toluene as organic solvent, 4 mL sample solution added with 0.1 mL of 1 mol/L NaOH solution, extraction time of 15 min, and stirring speed of 300 r/min. The sample solutions, containing a series of concentrations of tramadol, 0.05, 0.10, 0.50, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L, were analyzed. The good linearities were obtained for water, human urine and human plasma samples with the correlation coefficients of 0.9997, 0.9948 and 0.9985, respectively. The detection limits can reach 0.01 mg/L for water and human urine and 0.05 mg/L for human plasma. The relative standard deviations (RSDs) were 10.6% and 5.15% for water, 18.1% and 4.03% for urine solution at the spiked levels of 0.1 and 1.0 mg/L. The RSDs were 16.6% and 4.15% for plasma solution at the spiked levels of 0.5 and 1.0 mg/L. In comparison with conventional method, this method is simple, sensitive, fast, inexpensive, and environmentally friendly. It can be applied to pharmaceutical and forensic analysis.

Key words : liquid phase microextraction; hollow fiber membrane; gas chromatography (GC); tramadol; pethidine

曲马多(tramadol)是人工合成的非吗啡类镇痛剂,主要治疗中等疼痛,其结构式见图1。曲马多与滥用镇痛药度冷丁和氯胺酮在结构上很相似,有一定的成瘾性,但现在还是属于尚未管制的镇痛药物,其生产厂家多,销量大,购买相对比较方便,药物滥用问题一直备受关注^[1],在法医学上有人用固相

微萃取方法提取过滥用者毛发中的曲马多^[2]。

生物检材中的提取分析方法主要是液液萃取法,然后用色谱法、色谱-质谱联用法分析。但是传统的液液萃取方法常显得繁琐费时,且污染环境,对操作者本身的危害较大。液相微萃取(liquid phase microextraction, LPME)是最近开发的从水或生物

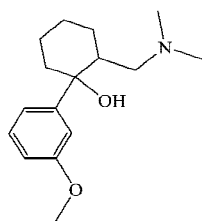


图 1 曲马多的化学结构

Fig.1 Chemical structure of tramadol

样品中提取有机化合物的新技术。其中,属于 LPME 萃取法的单滴微萃取(single drop microextraction, SDME)是将萃取液直接接触样品溶液或者悬于样品顶部空间,使分析物从水相转移至有机相(萃取溶剂),经一定时间后将部分有机微滴回注射器并转移至气相色谱仪进行分析^[3-4]。

然而,由于 SDME 法的悬滴液的物理稳定性较差,最近人们开始采用中空纤维膜加以保护。也有人把这种方法表述为中空纤维膜液相微萃取(liquid phase microextraction supported by hollow fiber membrane, LPME-HFM)^[5]。多孔纤维作为检材和有机溶剂的界面,避免了两相直接混合,同时也解决了传统的液液萃取操作费时、容易乳化和需要大量检材等问题。应用纤维膜萃取被认为是单滴微萃取的最新发展,分析物从检材水溶液中萃取出来后,进入中空纤维膜内的少量溶剂中。目前该方法多用于水溶液中比较简单的有机化合物的提取。可以说在具体应用方面还处在起步阶段,需要探讨的问题很多。本文采用 LPME-HFM 对水和生物体液中的曲马多镇痛药进行萃取,并对萃取条件进行了优化。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂及溶液配制

HP-5890 气相色谱仪,配氢火焰离子化检测器(FID);Easy 3000 色谱工作站(浙江大学环境工程研究所开发)。温控磁力搅拌器。中空纤维膜购自天津膜天膜科技有限公司,为聚偏氟乙烯(PVDF)材料,型号 FP-T,纤维内径/外径:0.65 mm/1.0 mm,膜壁平均孔径为 0.2 μm。盐酸曲马多由市售药片经结晶精制而成,经熔点测定符合药典要求。度冷丁内标物由公安部物证鉴定中心提供。血浆和尿样来自于健康人。用于 LPME-HFM 萃取液的甲苯是色谱标准品(纯度 ≥ 99.5%),异辛烷为色谱纯(纯度 ≥ 99.5%),环己烷与氯仿均为分析纯。

将曲马多配成 10 g/L 水溶液作为储备液(曲马多为盐酸盐,配成等摩尔浓度应为 11.3 g/L),度冷丁配成 10 g/L 作为内标储备液;做血浆的标准曲线时,血浆用 3 倍体积的蒸馏水稀释。储备液放在

冰箱中于 4 °C 下保存,血浆在 -20 °C 条件下保存。

1.2 色谱条件

熔融石英毛细管柱 HP-1(甲基硅酮)(膜厚 0.52 μm,0.32 mm i. d. × 25 m)。程序升温:初始柱温 100 °C,保持 1 min,以 25 °C/min 的升温速率升至 270 °C。汽化室和检测室温度分别为 250 °C 和 260 °C。氮气作为载气,进样 1 min 后开始分流。

1.3 萃取步骤

1.3.1 检液中曲马多的萃取

取检液(自来水、尿或血浆)4 mL,加 4 μL 内标液(度冷丁稀释到 1 g/L),再加入 0.1 mL NaOH 溶液(1 mol/L)至 6 mL 玻璃瓶中,在玻璃瓶中放入磁性转子(7 mm 长),于室温下在磁力搅拌器上搅拌,同时插入 LPME-HFM 萃取装置。

1.3.2 LPME-HFM 萃取装置的制备

自制的 LPME-HFM 萃取装置是由微量进样器和中空纤维膜两部分组成的。从中空纤维膜组件上剪取 2 cm 长度的纤维膜,在异辛烷中超声清洗 1 min 以除去膜上的污物,在自然条件下晾干,放入干净的玻璃瓶中保存。用微量注射器抽入 4 μL 萃取液,将一段中空纤维膜的一端套在注射器的针尖上,然后把萃取溶剂缓慢注入,注入完毕后,将另一端进行热封口。萃取结束后剪开中空纤维膜的封口端,抽取 1 μL 萃取液进样分析。

1.3.3 标准曲线的制作

将自来水、空白血浆和尿分别配制成 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/L 系列质量浓度,加入内标液。以曲马多与内标物的峰高比(Y)对曲马多的质量浓度(X, mg/L)做工作曲线。

2 结果

2.1 曲马多的色谱分离

图 2 是水样经中空纤维膜提取后的色谱图。可以看出,曲马多和内标得到了较好的分离,两峰附近没有过多杂质干扰。

2.2 LPME-HFM 主要条件的优化

为了找到较好的萃取条件,对影响萃取效果的主要参数进行了优化,包括萃取溶剂、样品溶液的碱性、萃取时间、搅拌速度。

用含 1 mg/L 曲马多的溶液进行条件优化实验(由于在没有找到合适的有机溶剂之前萃取得到的峰值很低,故在对有机溶剂优化时使用 20 mg/L 的高浓度进行优化,不影响结果)。开始的原始参数条件为:异辛烷作为萃取溶剂,加 0.1 mL NaOH 溶液(1 mol/L)调为碱性,萃取 10 min,搅拌速度为 500 r/min。

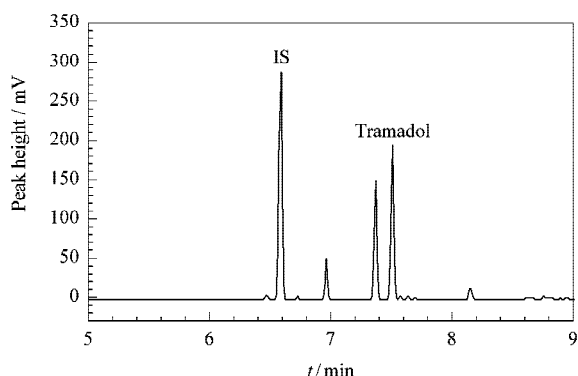


图 2 含 0.5 mg/L 曲马多和度冷丁(内标)的水样的气相色谱图

Fig.2 Chromatogram of a water sample containing 0.5 mg/L tramadol and pethidine (internal standard , IS)

2.2.1 萃取溶剂

液相微萃取法所使用的萃取溶剂极其微量,要求相对挥发性较低,水中的溶解度尽可能小,相对分子质量不宜太小。选择了几种常用的有机溶剂(氯仿、环己烷、异辛烷和甲苯)进行优化实验。图 3 是不同萃取溶剂得到的曲马多的峰高值,结果显示,用甲苯的提取效果远高于其他溶剂;氯仿的提取效果最差,而且稳定性不好,在萃取过程中易出现气泡。

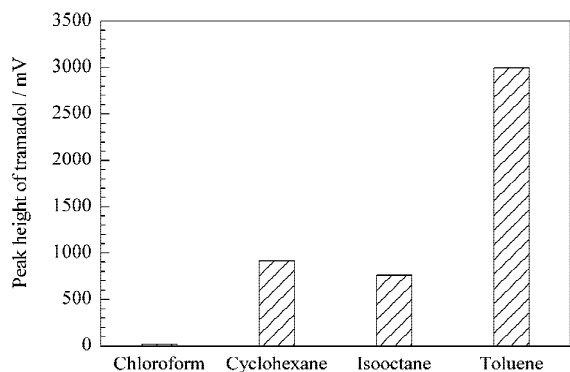


图 3 以氯仿、环己烷、异辛烷和甲苯为萃取溶剂的萃取效果
Fig.3 Efficiency of extraction using chloroform , cyclohexane , isooctane and toluene as extraction solvents

2.2.2 碱性

为了游离出曲马多,分别在 3 种碱性条件下考察萃取效果。图 4 是在不同碱性环境下得到的曲马多的峰高值,结果显示碱性强弱对结果影响不大。为在生物样品分析时确保待测溶液呈明显碱性,加入 0.1 mL 的 1 mol/L NaOH 溶液。

2.2.3 萃取时间

考察了不同的萃取时间(5, 10, 15, 20, 30 和 45 min)对萃取效果的影响,结果见图 5。随着萃取时间的加长,曲马多的峰高逐渐增加,30 min 时最高,超过 30 min 则有下降的趋势;由于萃取时间较长时,经常造成萃取溶剂的损失而出现气泡,而 20

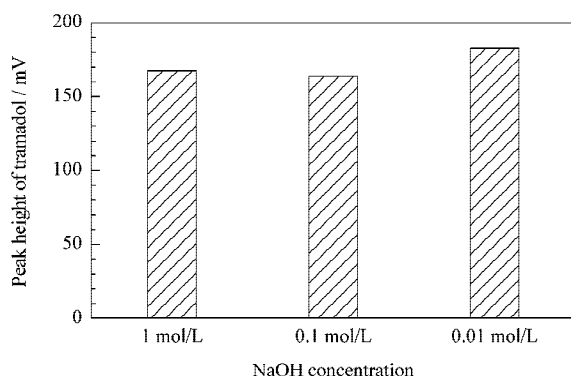


图 4 曲马多在 3 种不同的 NaOH 浓度下的萃取效果
Fig.4 Efficiency of extraction under different concentrations of NaOH

min 的萃取结果比 15 min 的萃取结果并没有较高的提升,因此选择了相对平稳的时间段 15 min。这一萃取时间也充分考虑了快速分析的需要。

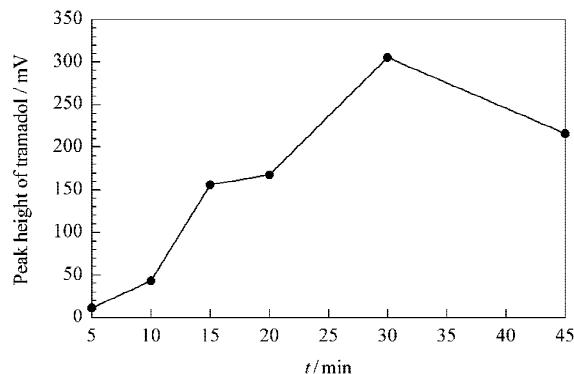


图 5 萃取效果与萃取时间的关系
Fig.5 Relationship of extraction efficiency and exposure time

2.2.4 搅拌速度

适度的搅拌可以加快药物从水相向有机相的转移,但是过快的速度会使得水相(尤其是尿和血浆)产生泡沫,过快的分子运动还会使萃取液中产生气泡,种种因素造成萃取效果的不稳定性。因此选择 300 r/min 作为搅拌速度。

2.3 精密度试验

在 2 个添加浓度水平下,自来水、尿和血浆进样 6 次的相对标准偏差(RSD)见表 1,显示了较好的重现性。在 1.0 mg/L 的浓度下比低浓度具有更好的重现性。

2.4 线性试验和检测限

自来水、尿和血浆中曲马多的标准曲线回归方程依次为 $Y = 0.721X + 0.0411$ ($r^2 = 0.9997$); $Y = 0.587X + 0.0564$ ($r^2 = 0.9948$); $Y = 1.0041X + 0.0301$ ($r^2 = 0.9985$)。实测结果表明最低检测限可达 0.01 mg/L (自来水和尿)和 0.05 mg/L (血浆)。

表 1 水、尿样和血浆样品中曲马多测定的精密度、最低检测限、线性范围及相关系数
Table 1 Precisions, limits of detection, linear ranges, and correlation coefficients (r^2) of the analysis of tramadol in water, urine and plasma samples

Sample	Precisions(RSD, % $n = 6$)		LOD/(mg/L)	Linear range/(mg/L)	r^2
	0.1 mg/L	1.0 mg/L			
Water	10.6	5.15	0.01	0.01 - 10	0.9997
Urine	18.1	4.03	0.01	0.01 - 10	0.9948
Plasma	16.6*	4.15	0.05	0.05 - 10	0.9985

* Spiked level :0.5 mg/L.

3 讨论

本文采用中空纤维膜液相微萃取技术,建立了从生物样品中提取曲马多的简便快速的方法,即在室温(20℃)下用PVDF中空纤维膜提取15min,使用4μL有机溶剂。中空纤维膜是一种具有特殊选择性分离功能的高分子材料,它能把流体物质分隔成不相同的两个部分,使其中的一种或几种物质能透过,而将其他物质分离出来。与常规分离方法相比,膜分离过程具有能耗低、分离效率高、过程简单、不污染环境等优点,已广泛应用于水处理等领域,成为本世纪分离科学中最重要的技术之一。最近几年,研究者把中空纤维膜应用到分析化学领域,改良了LPME技术。本文所用的PVDF中空纤维微孔膜是国外近年来新发展起来的一种膜,其特点是化学稳定性好、机械强度高、抗氧化剂性能好、耐酸碱、抗污染性好、膜透过通量高。本实验的研究也表明,LPME-HFM技术具有高效、简单、快速、低价、避免残留和交叉污染并可实现自动化等优点,可与气相色谱、毛细管电泳、高效液相色谱仪等兼容。目前,LPME-HFM在国际上主要用于环境污染的检

测,如化工试剂氯苯胺的检测^[6]、各种杀虫剂和生物杀灭剂的检测^[7-8],以及极性药物的检测^[9]。我们应用这项技术很好地完成了曲马多药物的检测,说明这项技术在药物分析和法医毒物分析领域有很广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Miranda H F, Pinaridi G. *Pharmacol Biochem Behav*, 1998, 61(4):357
- [2] Hadidi K A, Almasad J K, Al-Nsour T, Abu-Ragheib S. *Forensic Sci Int*, 2003, 135:129
- [3] Psillakis E, Kalogerakis N. *J Chromatogr A*, 2001, 938:113
- [4] Zhang Zhaohui, Kang Shaoying, Xu Minjie, Ma Ming, Chen Bo, Yao Shouzhuo. *Chinese Journal of Chromatography* (张朝辉,康绍英,许敏洁,马铭,陈波,姚守拙. 色谱), 2005, 23(4):358
- [5] Basheer C, Obbard J P, Lee H K. *J Chromatogr A*, 2005, 1068:221
- [6] Peng J F, Liu J F, Jiang G B, Tai C, Huang M J. *J Chromatogr A*, 2005, 1072:3
- [7] Hou L, Lee H K. *J Chromatogr A*, 2004, 1038:37
- [8] Lambropoulou D A, Albanis T A. *J Chromatogr A*, 2005, 1072:55
- [9] Ho T S, Reubsat J L E, Anthonen H K, Bjergaard S P, Rasmussen K E. *J Chromatogr A*, 2005, 1072:29