

LC/MS/MS法测定血浆、羊水中曲马多及其活性代谢物氧去甲基曲马多

肇丽梅¹, 陈笑艳², 崔健君³, SUNITA Maleku³, 钟大放^{2*}

(1. 中国医科大学 附属第二医院 临床药理研究室, 辽宁 沈阳 110004; 2. 沈阳药科大学 药物代谢与药动力学实验室, 辽宁 沈阳 110016; 3. 中国医科大学 附属第二医院 麻醉科, 辽宁 沈阳 110004)

摘要: 目的 建立液相色谱-串联质谱法(LC/MS/MS)同时测定血浆和羊水中曲马多和氧去甲基曲马多,并研究其在母体和胎儿体内分布。方法 生物样本经液-液提取,通过液相色谱-串联质谱,以选择离子反应监测(SRM)方式进行检测。结果 测定血浆样品曲马多和氧去甲基曲马多的线性范围为 $8.0800.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;测定羊水样品曲马多和氧去甲基曲马多的线性范围为 $1.0400.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。12例剖宫产产妇术前im盐酸曲马多($1.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)后,血浆中曲马多和氧去甲基曲马多浓度较高,羊水中曲马多浓度较低,且未检测出氧去甲基曲马多。结论 本方法操作简便、灵敏度高,可用于临床药代动力学研究。

关键词: 曲马多; 氧去甲基曲马多; 液相色谱-质谱; 人血浆; 羊水

中图分类号: R917.101 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)06-0458-05

Determination of tramadol and its active metabolite *O*-desmethytramadol in plasma and amniotic fluid using LC/MS/MS

ZHAO Li-mei¹, CHEN Xiao-yan², CUI Jian-jun³, SUNITA Maleku³, ZHONG Da-fang^{2*}

(1. Laboratory of Clinical Pharmacology, China Medical University No. 2 Hospital, Shenyang 110004, China;
2. Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China;
3. Department of Anaesthesiology, China Medical University No. 2 hospital, Shenyang 110004, China)

Abstract: **Aim** To determinate tramadol and *O*-desmethytramadol in human plasma and amniotic fluid by LC/MS/MS, and distribution of tramadol and *O*-desmethytramadol in maternity and fetus were studied. **Methods** Samples containing tramadol, *O*-desmethytramadol and diphenhydramine (internal standard, IS) were extracted using liquid-liquid extraction, followed by liquid chromatographic separation and on-line MS/MS using atmospheric pressure chemical ionization as an interface detection. The analytes were detected in the selected reaction monitoring mode. **Results** The calibration curves for tramadol and *O*-desmethytramadol in plasma and amniotic fluid were linear in the range from 8.0 to 800.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (plasma) and 1.0 to 400.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (amniotic fluid). The method was applied to the measurement of tramadol and *O*-desmethytramadol concentrations in maternal vein, umbilical vein, umbilical artery and amniotic fluid. Following intramuscular pre-operative administration $1.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ doses of tramadol to parturients, plasma concentrations of tramadol were significantly higher than those in amniotic fluid. The concentrations of *O*-desmethytramadol in plasma were lower, and were not detected in amniotic fluid. **Conclusion** The method is shown to be accurate, robust and convenient, and suitable for clinical pharmacokinetics studies of tramadol and *O*-desmethytramadol.

Key words: tramadol; *O*-desmethytramadol; liquid chromatography tandem mass spectrometry; human plasma; amniotic fluid

曲马多(tramadol)为阿片受体弱激动剂,通过作用于去甲肾上腺素和5-羟色胺能神经传递系统而起镇痛作用。与其他强效阿片受体激动剂(吗啡、哌替啶等)相比,曲马多较少发生呼吸抑制、心脏抑制等

收稿日期: 2003-07-25

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

不良反应,因此,临床采用该药治疗中轻度疼痛,并用于分娩止痛^[1]。

据文献^[2,3]报道,曲马多在体内发生广泛代谢,在肝脏主要的代谢途径为O-去甲基、N-去甲基和环氧化,在已发现的23个代谢物中,代谢物氧去甲基曲马多(O-desmethyltramadol)具有比母体药物强的药理活性,动物试验显示其镇痛作用是母体药物的2~4倍,因此除母体药物外,氧去甲基曲马多的体内浓度也是评价曲马多体内作用的重要指标之一。

有关曲马多穿过胎盘屏障的研究报道不多,目前仅有母体血浆中和胎儿脐静脉血中曲马多浓度的比值结果^[4]。为考察曲马多及其活性代谢物在母体、胎儿和羊水中的分布,本文建立了同时测定母体血、胎儿脐带血和羊水中曲马多和氧去甲基曲马多浓度的液相色谱-串联质谱法(LC/MS/MS),并采用该方法,测定了12例术前肌注盐酸曲马多的剖宫产产妇母体血、胎儿脐静脉和脐动脉血、羊水中曲马多和氧去甲基曲马多浓度。

材料与方 法

药品 盐酸曲马多对照品由锦州化学制药厂提供(含量99.2%,批号990612);氧去甲基曲马多对照品为德国Grünenthal GmbH公司产品(含量99.8%,批号TK-168);盐酸曲马多注射液为德国格兰泰有限公司产品(规格0.1 g/2 mL);盐酸苯海拉明对照品(内标)由中国药品生物制品检定所提供。

仪器 美国Finnigan公司TSQ型液相色谱-质谱-质谱联用仪。配有大气压化学离子源(APCI)及Xcalibur 1.1数据处理系统和LCQuan 1.1定量软件;日本岛津公司LC-10 AD高效液相色谱输液泵。

色谱条件 色谱柱为Diamondsil C₈柱(250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm, 北京迪马公司);流动相为乙腈-水-甲酸(60:40:2);流速为0.5 mL·min⁻¹;柱温为20℃。

质谱条件 离子源为APCI源,气化室温度为450℃,加热毛细管温度280℃。鞘气(N₂)压力0.6 MPa,辅助气(N₂)流速3 L·min⁻¹,碰撞气(Ar)压力1.9 Pa;碰撞诱导解离(CID)电压为25 V;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 264 → m/z 58(曲马多), m/z 250 → m/z 58(氧去甲基曲马多)和 m/z 256 → m/z 167(内标,苯海拉明)。

血浆样品处理 取血浆0.25 mL,置10 mL带塞试管中。加入流动相50 μL,内标(1 mg·L⁻¹苯海拉明流动相溶液)100 μL。加入0.5 mol·L⁻¹ NaOH溶

液50 μL,混匀。加乙酸乙酯2 mL,涡流1 min,往复振荡10 min,离心5 min。分取有机相置另一带塞试管中,40℃下氮气吹干。残留物加流动相100 μL溶解,取20 μL进行LC/MS/MS分析。

羊水样品处理 取羊水0.25 mL,置10 mL带塞试管中。加入流动相50 μL,内标(1 mg·L⁻¹苯海拉明流动相溶液)100 μL。加入1 mol·L⁻¹ NH₃·NH₄Cl缓冲液50 μL,混匀。以下同“血浆样品处理”。

结 果

1 质谱分析

曲马多、氧去甲基曲马多和内标在APCI离子化方式下,主要生成[M+H]⁺准分子离子峰,分别为 m/z 264, 250和256。选择性对[M+H]⁺进行产物离子扫描(图1),生成的主要碎片离子分别为 m/z 58, 58和167,将这些主要碎片离子作为定量分析时监测的产物离子。虽然曲马多和氧去甲基曲马多离子扫描生成的主要碎片离子均为 m/z 58,但SRM监测此离子时,二者未出现“cross-talk”现象。

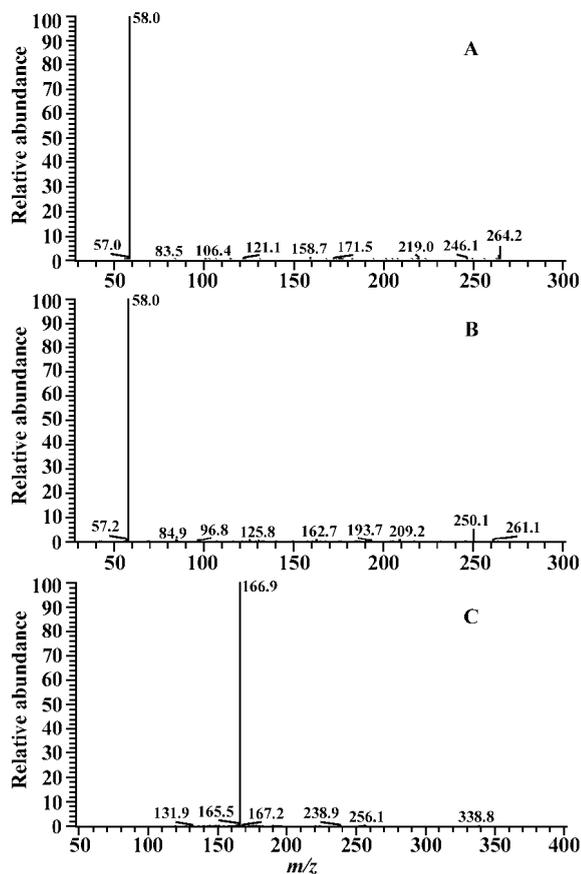
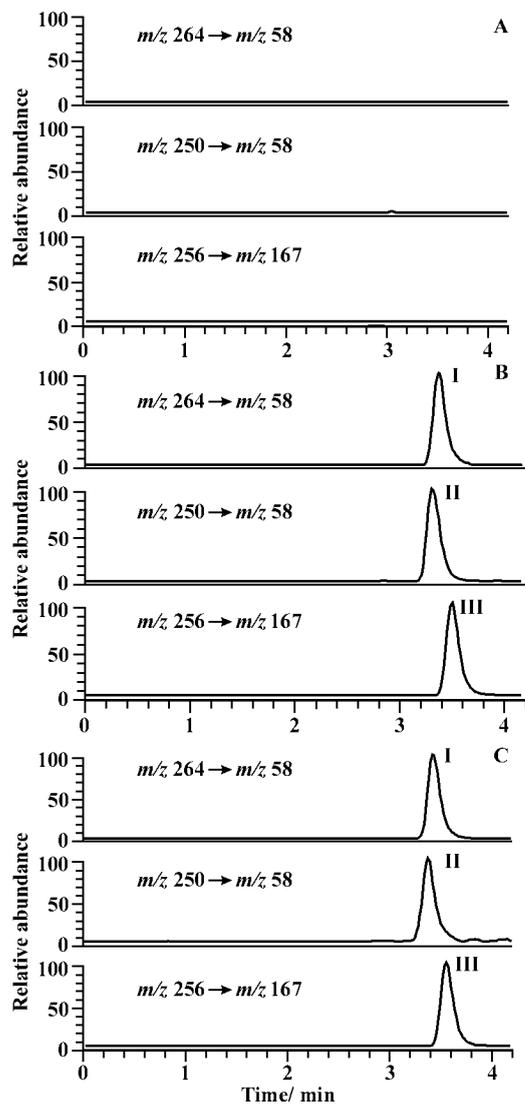


Figure 1 Production spectra of tramadol (A), O-desmethyltramadol (B) and diphenhydramine (C, IS) with each protonated molecule [M+H]⁺ as a precursor ion

2 方法专属性

取血浆或羊水 0.25 mL, 分别按照“样品处理”项下操作, 进行分析。结果表明样品中内源性物质不干扰曲马多和氧去甲基曲马多的测定。空白血浆或羊水色谱图、空白血浆或羊水加标准品色谱图、患者给药后收集的样品色谱图见图 2, 图 3。



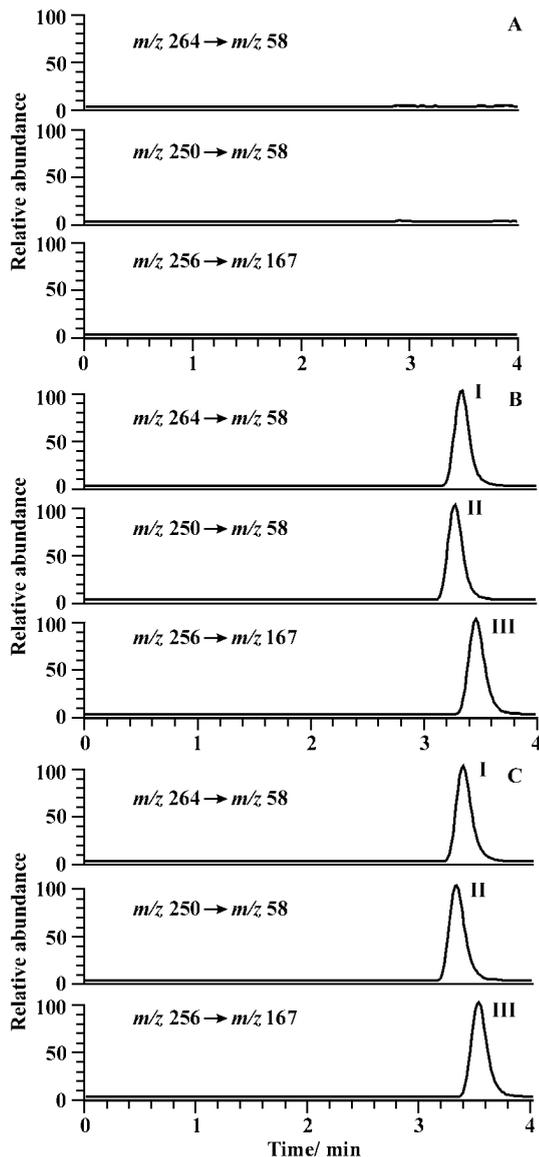
A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with tramadol ($160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), *O*-desmethyltramadol ($160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and IS ($200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); C: Plasma of patient; I, II and III refer to tramadol, *O*-desmethyltramadol and IS, respectively

Figure 2 Typical chromatograms of tramadol, *O*-desmethyltramadol and diphenhydramine (IS) in plasma by selected reaction monitoring scan mode

3 标准曲线和线性范围

取空白血浆或羊水 0.25 mL, 置 10 mL 带塞试管中, 依次加入曲马多和氧去甲基曲马多标准系列混合溶液 50 μL , 使曲马多血浆浓度为 8.0, 20.0,

48.0, 160.0, 400.0 和 $800.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 羊水中浓度为 1.0, 2.4, 8.0, 20.0, 48.0, 160.0, 400.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 在以上介质中, 氧去甲基曲马多浓度同曲马多。除不加入流动相 50 μL 外, 按“样品处理”依法操作, 分别建立两种待测物在两种生物基质中的标准曲线。以生物样品中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 ($1/C^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线。



A: Blank amniotic fluid; B: Blank amniotic fluid spiked with tramadol ($160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), *O*-desmethyltramadol ($160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and IS ($200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); C: Amniotic fluid of patient; I, II and III refer to tramadol, *O*-desmethyltramadol and IS, respectively

Figure 3 Typical chromatograms of tramadol, *O*-desmethyltramadol and diphenhydramine (IS) in amniotic fluid by selected reaction monitoring scan mode

测定血浆样品的典型回归方程为: $Y = -1.58 \times 10^{-4} + 6.90 \times 10^{-4} C$, $r = 0.9961$ (曲马多); $Y = -7.79 \times 10^{-4} + 1.96 \times 10^{-4} C$, $r = 0.9953$ (氧去甲基曲马多); 线性范围为 $8.0 \sim 800.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 定量下限为 $8.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

测定羊水样品的典型回归方程为: $Y = 1.36 \times 10^{-3} + 2.16 \times 10^{-3} C$, $r = 0.9989$ (曲马多); $Y = -1.76 \times 10^{-4} C + 1.72 \times 10^{-3}$, $r = 0.9957$ (氧去甲基曲马多); 线性范围为 $1.0 \sim 400.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 定量下

限为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 精密度和准确度

取空白血浆或羊水 0.25 mL , 按“标准曲线”项下方法制备曲马多和氧去甲基曲马多低、中、高3个浓度(血浆浓度: $20.0, 160.0, 800.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 羊水浓度: $8.0, 48.0, 400.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的血浆或羊水样品, 每个浓度进行5样品分析, 计算精密度与准确度。

测定血浆样品和羊水样品中曲马多和氧去甲基曲马多方法的精密度与准确度结果见表1。

Table 1 Accuracy and precision for the analysis of tramadol and O-desmethytramadol in human plasma

Drug	Plasma				Amniotic fluid			
	Added/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Measured/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RE/ %	RSD/ %	Added/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Measured/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RE/ %	RSD/ %
Tramadol	20.00	21.06	5.3	5.2	8.00	8.32	4.0	5.7
	160.0	156.3	-2.3	3.3	48.0	50.7	5.6	2.7
	800.0	821.7	2.7	4.6	400.0	393.2	-1.7	3.2
O-Desmethytramadol	20.00	21.03	5.2	8.3	8.00	8.38	4.8	3.0
	160.0	154.2	-3.6	5.1	48.0	51.8	7.9	2.3
	800.0	814.8	1.9	4.0	400.0	394.4	-1.4	3.6

5 提取回收率

取空白血浆或羊水 0.25 mL , 按“精密度和准确度”项下方法制备曲马多和氧去甲基曲马多低、中、高3个浓度血浆或羊水样品, 每一浓度进行5样本分析。以提取后的色谱峰面积与相同浓度样品未经提取获得的色谱峰面积之比, 考察样品的提取率。3种浓度下血浆中待测物的提取回收率分别为 $58.3\%, 59.3\%, 50.3\%$ (曲马多) 和 $43.5\%, 56.6\%, 44.3\%$ (氧去甲基曲马多); 羊水样品中待测物提取回收率分别为 $87.2\%, 82.9\%, 77.0\%$ (曲马多) 和 $65.6\%, 66.5\%, 61.2\%$ (氧去甲基曲马多)。

6 曲马多及氧去甲基曲马多在母体和胎儿体内分布

选择 ASA I 级剖宫产产妇 12 例, 术前 im 盐酸曲马多 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。胎儿娩出同时经母体足背动脉取血; 胎儿娩出尚未建立呼吸时双钳法取中段脐带, 采集脐动、静脉血, 同时采集羊水, 记录给药至胎儿娩出的时间。

用 LC/MS/MS 法测定血浆样品和羊水样品中曲马多和氧去甲基曲马多的浓度。结果表明, 在选择 12 例给药至胎儿娩出时程为 25 min 的剖宫产产妇中, 母体血和胎儿脐静脉血中曲马多浓度较高, 分别为 $(427 \pm 161) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(418 \pm 88) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 脐动脉血中曲马多浓度为 $(289 \pm 46) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 羊水中浓度较低, 仅为 $(105 \pm 87) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。氧去甲基曲马多在

母体血中浓度相对较高, 为 $(30 \pm 10) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 胎儿脐动、静脉血中浓度分别为 $(12 \pm 4) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(22 \pm 10) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 羊水中未检测出氧去甲基曲马多。给药至胎儿娩出时程为 30 min 的 6 例剖宫产产妇, 其对应样本中曲马多和氧去甲基曲马多浓度均有所下降。

讨论

有文献报道采用 HPLC 法^[5,6]、GC-MS 法^[7] 和 HPCE^[8,9] 法测定生物样品中的曲马多和氧去甲基曲马多, 样品预处理较复杂且测试周期长。近年有报道采用液相色谱-串联质谱法^[2] (LC/MS/MS) 鉴定曲马多在人体内的代谢产物。但测定羊水中曲马多及活性代谢产物氧去甲基曲马多浓度未见报道。本文建立了同时测定羊水及血浆中曲马多和活性代谢产物的 LC/MS/MS 法, 可满足临床药代动力学研究需要。

实验中考察了不同有机溶剂及碱化试剂对生物介质中曲马多和氧去甲基曲马多提取回收率的影响。结果发现, 用乙酸乙酯提取, 两种待测物均有较高的回收率。生物样品采用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_3 \cdot \text{NH}_4 \text{Cl}$ 缓冲液碱化处理时, 曲马多和氧去甲基曲马多可获得较高的提取回收率。但受离子抑制效应的影响, 采用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_3 \cdot \text{NH}_4 \text{Cl}$ 缓冲液对血浆样品进行碱化处理时, 曲马多和氧去甲基曲马多的测量结果

误差较大(RE > 30 %), 导致血浆样品标准曲线线性较差($r < 0.88$)。而改用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 对含曲马多和氧去甲基曲马多血浆样品进行碱化处理, 可获得稳定、重现性好的提取回收率。实验中还考察了流动相组成对待测物质谱响应的影响, 发现含有乙腈的流动相可提高待测物响应, 且较高浓度的乙腈可降低背景噪音。

剖宫产产妇术前给予盐酸曲马多后, 胎儿血浆中曲马多的浓度较高, 而且脐静脉血浓度高于脐动脉血, 可能因为胎儿对药物有一定代谢。羊水中未能检测出氧去甲基曲马多, 这从胎儿血中较低的代谢物水平可以解释。盐酸曲马多用于分娩止痛少有胎儿呼吸抑制发生, 但对所应用的剂量和药物及代谢物分布尚无报道, 因此本试验结果对指导临床用药具有一定的意义。

致谢: 氧去甲基曲马多标准品为白求恩国际和平医院临床药理室刘会臣教授赠送。

References:

- [1] Lee CR, McTavish D, Eugene M, *et al.* Tramadol: a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states [J]. *Drugs*, 1993, **46**(2): 313 - 340.
- [2] Wu WN, McKonw LA, Liao S. Metabolism of the analgesic drug ULTRAM (tramadol hydrochloride) in humans: APF MS and MS/MS characterization of metabolites [J]. *Xenobiotica*, 2002, **32**(5): 411 - 425.
- [3] Hennies HH, Friderichs E, Schneider J. Receptor binding analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids [J]. *Arzneimittelforschung*, 1988, **38**: 877 - 880.
- [4] Husslein P, Kubista E, Egarter C. Obstetrical analgesia with tramadol results of a prospective randomized comparative study with pethidine [J]. *Z Geburtshilfe Perinatol*, 1987, **191**(6): 234 - 237.
- [5] Nobilis M, Kopecky J, Kvetina J, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of tramadol and its *O*-desmethylated metabolite in blood plasma. Application to a bioequivalence study in humans [J]. *J Chromatogr A*, 2002, **949**(1 - 2): 11 - 12.
- [6] Gan SH, Ismail R. Validation of high-performance liquid chromatography method for tramadol and *O*-desmethyltramadol in human plasma using solid-phase extraction [J]. *J Chromatogr B*, 2001, **759**(2): 325 - 335.
- [7] Tao Q, Stone DJ Jr, Borenstein MR. Gas chromatographic method using nitrogen - phosphorus detection for the measurement of tramadol and its *O*-desmethyl metabolite in plasma and brain tissue of mice and rats [J]. *J Chromatogr B*, 2001, **763**(1 - 2): 165 - 171.
- [8] Liu HC, Yang YY, Wang YL, *et al.* Determination of the enantiomers of (±)-*trans* tramadol and (±)-*trans O*-demethyltramadol in human serum and its application in therapeutic drug monitoring [J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2000, **16**(5): 377 - 380.
- [9] Liu HC, Hou YN, Liu TJ, *et al.* Stereoselectivity in pharmacokinetics of the enantiomers of *trans* tramadol [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, **35**(1): 40 - 43.