

LC-MS/MS法同时测定曲马多和代谢物 *O*-脱甲基曲马多的血药浓度及其药动力学研究^Δ

张相彩^{1*}, 徐颖颖^{1#}, 吕小琴², 徐静³, 汪国香¹, 江波⁴, 王怀冲¹, 王宇¹, 蔡鑫君¹, 张琳¹, 倪坚军¹(1. 杭州市红十字会医院, 杭州 310003; 2. 浙江省药品不良反应监测中心, 杭州 310012; 3. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 杭州 310016; 4. 浙江大学医学院附属第二医院, 杭州 310003)

中图分类号 R969.1; R971⁺.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)18-1662-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.18.10

摘要 目的: 建立同时测定术后患者应用曲马多后的曲马多和活性代谢物 *O*-脱甲基曲马多(M_1)血药浓度的方法。方法: 血浆样品 50 μ l 以乙腈溶液 150 μ l (含内标氟康唑) 沉淀蛋白处理后, 采用液-质联用(LC-MS/MS)法进行测定, 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈, 流动相为 0.1% 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液(梯度洗脱); 用于定量分析的离子反应 m/z 分别为曲马多 264.2 \rightarrow 58.6、 M_1 250.0 \rightarrow 58.6、氟康唑 307 \rightarrow 220。结果: 2种待分析物血药浓度均在 5~1 000 ng/ml 范围内线性关系良好, 日内、日间 RSD 均 <10%; 方法回收率分别为 92.26%~100.01%、88.45%~100.60%。结论: 本方法准确、快速、灵敏, 可用于曲马多和 M_1 的血药浓度测定及药动力学研究。

关键词 曲马多; *O*-脱甲基曲马多; 高效液相质谱法; 药动力学; 血药浓度

Simultaneous Determination of Tramadol and Metabolite *O*-demethyl Tramadol in Plasma by LC-MS/MS and Pharmacokinetic Study

ZHANG Xiang-cai¹, XU Ying-ying¹, LYU Xiao-qin², XU Jing³, WANG Guo-xiang¹, JIANG Bo⁴, WANG Huai-chong¹, WANG Yu¹, CAI Xin-jun¹, ZHANG Lin¹, NI Jian-jun¹(1. Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou 310003, China; 2. Zhejiang ADR Monitoring Center, Hangzhou 310012, China; 3. Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China; 4. The Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of tramadol and active metabolite *O*-demethyl tramadol (M_1) in the plasma of postoperative patients treated with tramadol. METHODS: Tramadol and M_1 in plasma were determined simultaneously by LC-MS/MS after the plasma sample 50 μ l was precipitated with acetonitrile 150 μ l containing fluconazol. The determination was performed on Zorbax SB-C₁₈ with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-5 mmol/L ammonium acetate solution-0.1% formic acid acetonitrile solution (gradient elution); m/z was 264.2 \rightarrow 58.6 for tramadol, 250.0 \rightarrow 58.6 for M_1 and 307 \rightarrow 220 for fluconazol. RESULTS: The linear range of tramadol and M_1 both were 5-1 000 ng/ml; RSDs of intra-day and inter-day were lower than 10%; method recoveries were 92.26%-100.01% and 88.45%-100.60%. CONCLUSIONS: The method is accurate, rapid and sensitive, and can be used for the determination of plasma concentration of tramadol and M_1 and pharmacokinetic study.

KEYWORDS Tramadol; *O*-desmethyl tramadol; LC-MS/MS; Pharmacokinetics; Blood concentration

曲马多为中枢性镇痛药, 用于治疗轻中度疼痛。该药主要由细胞色素 P₄₅₀(CYP)2D6 和 CYP3A4^[1-2] 代谢为 *O*-脱甲基曲马多(M_1)和 *N*-去甲基曲马多(M_2), M_1 的止痛效果是曲马多的 6 倍, 与 μ 受体的结合力则是曲马多的 200 倍^[2]。曲马多和 M_1 的止痛作用取决于其血药浓度。文献报道测定其血药浓度的方法有很多, 如紫外检测法、高效液相色-荧光检测法^[1, 3-12]、高效液相色谱-二极管阵列检测法、液-质联用法^[13-15]、电泳法、高效液相色谱耦合荧光法及光电二极管阵列电喷雾电离质谱

(PDA-ESI-MS)^[12]法等, 但这些方法需要从生物样品中提取分析物并纯化。为此, 本研究建立一种简便、快速的液-质联用(LC-MS/MS)法, 测定术后患者应用曲马多止痛后体内曲马多和 M_1 的血药浓度, 并研究其药动力学。

1 材料

1.1 仪器

TSQ Quantum Access MS/MS 质谱仪, 包括 Accela 超高压溶剂泵、Accela 自动进样器、Accela 柱温箱、Lcquan 液质数据工作站(美国 Thermo Scientific 公司); Allegra™ 6R 离心机和 Allegra™ 64R 高速低温离心机(美国 Beckman 公司); BP 61S 电子天平(德国 Sartorius 公司); WH-866 涡旋仪(江苏太仓华美生化仪器厂); New Brunswick Scientific 超低温冰箱(德国 Eppen-

^Δ 基金项目: 浙江省科技厅资助项目(No.2010C33120)

* 主任药师。研究方向: 临床药学。电话: 0571-56109872。

通信作者: 主任药师。研究方向: 药事管理与临床药学。电话: 0571-56109870。E-mail: xuyingying208@163.com

dorf公司)。

1.2 药品与试剂

曲马多注射液(德国 Grunenthal GmbH 公司,批号:779A01);曲马多对照品(石药集团欧意药业有限公司,批号:2189081216);M₁对照品(加拿大 Toronto Research Chemicals Inc.,批号:4-AMC-85-3);氟康唑对照品(内标,绍兴民生医药有限公司,批号:FCZ01004035);乙酸铵、乙腈、乙酸为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

色谱柱:Zorbax SB-C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.8 μm);流动相:A(0.1%甲酸-5 mmol/L 乙酸铵溶液)-B(0.1%甲酸乙腈溶液),梯度洗脱程序:流动相 A 0~1.0 min 90%,1.5~3.0 min 10%,3.01~4.0 min 90%;流速:0.3 ml/min;柱温箱温度:30 ℃;自动进样器温度:5 ℃。

大气压化学电离源(APCI);反应离子监测(SRM),正离子模式,放电电流(Discharge current):4.0 V;汽化温度:400 ℃;鞘气(N₂)压力:40 Arb;辅助气(N₂)压力:8 Arb;毛细管温度:280 ℃;碰撞气压力:1.0 mTorr;用于定量分析的离子反应 m/z 分别为曲马多 264.2→58.6、M₁ 250.0→58.6、氟康唑 307→220;碰撞能量曲马多 32 eV、M₁ 16 eV、氟康唑 17 eV;扫描时间:0.1 s,扫描宽度(m/z):0.01。

2.2 血浆样品的制备

取血浆 50 μl,加入含内标(10 ng/ml 氟康唑)的乙腈溶液 150 μl,涡旋 20 s,在 4 ℃ 条件下以离心半径为 8 cm、转速为 20 000 r/min 离心 10 min,取上清液 100 μl 置入空进样瓶的内衬管,进样 10 μl 分析。

2.3 专属性考察

各取空白血浆、标准血浆、受试者血浆样品各 50 μl,分别按“2.2”项方法操作,记录色谱图(图1)。由图1可知,曲马多、M₁ 和内标氟康唑的峰形尖锐、对称,保留时间分别为 2.17、2.52、2.18 min,整个色谱分析过程为 4.0 min。空白血浆的内源性物质不干扰曲马多、M₁ 和内标氟康唑的测定,该法获得的色谱图具有高度专属性。

2.4 标准曲线及定量下限考察

分别取曲马多、M₁ 标准溶液适量,氮气吹干后加空白血浆依次稀释成质量浓度均为 1 000、500、200、100、50、10、5 ng/ml 的标准血浆样品,按“2.2”项方法操作制备标准曲线,记录色谱。分别以曲马多、M₁ 与内标氟康唑质谱峰面积比值(y)对样品浓度(x)采用最小二乘法进行线性回归,得回归方程分别为: $y_{\text{曲马多}}=0.014 8x_{\text{曲马多}}-0.028 5(r^2=0.999 6)$ 、 $y_{\text{M}_1}=0.014 3x_{\text{M}_1}-$

表 1 血药浓度精密度和准确度试验结果

Tab 1 Results of precision and accuracy tests

质量浓度, ng/ml	日内测得量($\bar{x} \pm s$),ng/ml		日内RSD,%		方法回收率,%		日间测得量($\bar{x} \pm s$),ng/ml		日间RSD,%		方法回收率,%	
	曲马多	M ₁	曲马多	M ₁	曲马多	M ₁	曲马多	M ₁	曲马多	M ₁	曲马多	M ₁
8	7.38±0.53	7.08±0.61	7.21	8.61	92.26	88.45	7.74±0.65	7.57±0.65	8.36	8.65	96.74	94.62
80	78.34±1.99	78.72±3.98	2.54	5.05	97.92	98.40	78.89±2.68	79.25±2.94	3.40	3.71	98.61	99.07
800	755.39±21.79	778.77±26.16	2.89	3.36	94.42	97.35	800.11±46.80	804.77±32.49	5.85	4.04	100.01	100.60

取已知低、中、高质量浓度(8、80、800 ng/ml)的对照品溶液直接进样分析得峰面积A;经预处理后的空白生物样本基质中加入对应质量浓度对照品溶液进样分析得峰面积B;配制相同质量浓度的血浆样品,依法处理并进样后得峰面积C。计算 ME=B/A×100%,RE=C/A×100%,结果见表2。

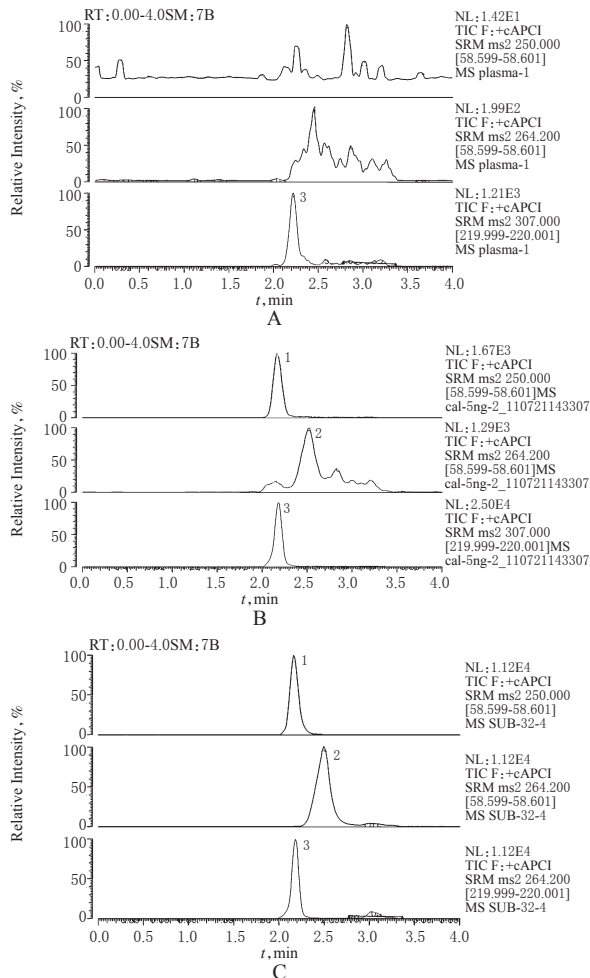


图1 选择反应监测图谱

A.空白血浆;B.标准血浆(5 ng/ml 曲马多);C.受试者血浆样品;1.曲马多;2.M₁;3.氟康唑

Fig 1 Selective reaction monitoring spectrum

A. blank plasma; B. standard plasma (5 ng/ml tramadol); C. blood plasma of the volunteer; 1. tramadol; 2. M₁; 3. fluconazol
0.001 4($r^2=0.999 9$)。结果表明 2 种待分析物均在 5~1 000 ng/ml 浓度范围内线性关系良好,定量下限均为 5 ng/ml。

2.5 精密度和准确度试验

取曲马多和 M₁ 低、中、高质量浓度(8、80、800 ng/ml)的对照品血浆样品各 6 份,按“2.2”项方法处理并测定。分别计算日内、日间精密度和准确度(方法回收率),结果见表 1。

2.6 绝对回收率(RE)与基质效应(ME)试验

2.7 稳定性试验

分别配制低、中、高 3 种质量浓度(8、80、800 ng/ml)对照品血浆样品,考察样品不同条件下的稳定性,包括血浆室温放置 2 h、血浆冻融 2 次、处理后进样液 40 ℃ 放置 24 h。稳定性试验结果见表 3。

表2 绝对回收率与基质效应试验结果

Tab 2 Results of absolute recovery and matrix effect tests

质量浓度, ng/ml	曲马多		M ₁		氟喹唑	
	ME, %	RE, %	ME, %	RE, %	ME, %	RE, %
8	121.32	101.69	139.02	108.86		
80	129.51	113.64	125.24	105.40		
800	123.14	106.87	116.01	98.67		
10					154.29	196.07

表3 稳定性试验结果

Tab 3 Results of stability tests

分析物	稳定性考察条件	8 ng/ml		80 ng/ml		800 ng/ml	
		$\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$	RE, %	$\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$	RE, %	$\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$	RE, %
曲马多	血浆室温放置2 h	7.81 ± 0.78	-2.37	74.12 ± 2.33	-7.35	778.23 ± 25.02	-2.67
	血浆冻融2次	8.81 ± 0.41	10.10	80.43 ± 1.83	0.54	834.52 ± 39.00	4.32
	处理后进样液4 °C放置24 h	8.46 ± 0.56	5.79	79.01 ± 3.89	-1.24	771.10 ± 38.25	-3.61
M ₁	血浆室温放置2 h	8.11 ± 0.34	1.33	77.63 ± 2.95	-2.96	810.94 ± 14.45	1.37
	血浆冻融2次	8.51 ± 0.65	6.31	80.57 ± 3.04	0.71	839.43 ± 20.14	4.93
	处理后进样液4 °C放置24 h	7.95 ± 0.48	-0.69	80.23 ± 3.07	0.28	764.37 ± 29.61	-4.45

M₁的浓度,经DAS 2.1.1药动学软件依据非房室模型处理并计算药动学参数,结果见表4。曲马多与M₁的平均药-时曲线见图2。

表4 曲马多与M₁的药动学参数($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Results of pharmacokinetic parameters of tramadol and M₁ ($\bar{x} \pm s$)

待分析物	半衰期($t_{1/2}$),h	药-时曲线下面积(AUC _{0-∞}), μg·h/L	清除率(CL),L·kg/h	平均滞留时间(MRT),h	峰浓度(c_{max}), μg/L	达峰时间(t_{max}),h
曲马多	7.06 ± 3.13	4 686.56 ± 1 661.96	24.16 ± 9.27	9.82 ± 4.07	682.47 ± 198.17	0.25 ± 0.19
M ₁	10.73 ± 5.82	754.58 ± 346.39	168.66 ± 112.05	16.76 ± 8.65	39.98 ± 15.26	3.66 ± 2.79

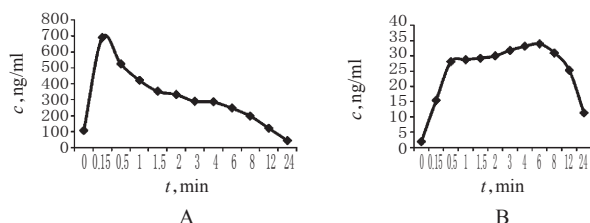


图2 曲马多与M₁的平均药-时曲线

A.曲马多;B.M₁

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of tramadol and M₁

A. tramadol; B. M₁

曲马多广泛用于术后患者止痛, M₁是体内唯一活性代谢物,与阿片受体有较高的亲和力,因此需同时测定曲马多和M₁的血药浓度。

文献报道^[3-14]的测定方法需要从生物样品中提取分析物并纯化。本方法直接沉淀蛋白,准确、快速、灵敏,且具有良好的线性、精密度和准确度。本方法测定曲马多和M₁的最低定量限均为5 ng/ml,线性范围均为5~1 000 ng/ml。曲马多的治疗血药浓度范围为100~300 ng/ml,故本方法可很好满足临床检测的需要,并成功用于药动学研究。非房室模型估计的药动学参数与文献报道^[1-2,14]一致。

本研究建立了LC-MS/MS法同时测定曲马多和M₁的血药浓度,并可用于曲马多和M₁的药动学研究。

参考文献

[1] Ardakani YH, Mehvar R, Foroumadi A, *et al.* Enantioselective determination of tramadol and its main phase I metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography B*, 2008,

2.8 临床应用

经杭州市红十字会医院和浙江大学医学院附属邵逸夫医院伦理委员会批准,45例手术后的患者单次注射曲马多注射液10.0 mg,于0、0.15、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24 h时取静脉血1 ml,枸橼酸钠抗凝,以离心半径为8 cm、转速为4 000 r/min离心10 min后分离血浆,于-80 °C保存备用。血浆样品按“2.2”项方法处理后进样测定,以随行标准曲线计算曲马多和

图2。

3 讨论

表4 曲马多与M₁的药动学参数($\bar{x} \pm s$)

864(1/2):109.

[2] Silva MF, Schramm SG, Kano EK, *et al.* Bioequivalence evaluation of single doses of two tramadol formulations: a randomized, open-label, two-period crossover study in healthy brazilian volunteers[J]. *Clinical Therapeutics*, 2010, 32(4):758.

[3] Curticepean A, Muntean D, Curticepean M, *et al.* Optimized HPLC method for tramadol and O-desmethyl tramadol determination in human plasma[J]. *Journal Biochemical Biophysical Methods*, 2008, 70(6):1 304.

[4] Kirchheiner J, Keulen JTHA, Bauer S, *et al.* Effects of the CYP2D6 gene duplication on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tramadol[J]. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 2008, 28(1):78.

[5] Rouini MR, Ghazi-Khansari M, Ardakani YH, *et al.* A disposition kinetic study of tramadol in rat perfused liver[J]. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2008, 29(4):231.

[6] 张亮,道毅俊,李中东,等.HPLC荧光法测定盐酸曲马多及其片剂人体生物等效性[J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(13):1 011.

[7] 虞建刚,王俊科,李平,等.细胞色素P₄₅₀2D6*10基因多态性对曲马多药代动力学的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2008, 28(8):677.

[8] 赵东祥,李强,王彦慧,等.单剂量口服盐酸曲马多在蒙古族和汉族健康受试者的药代动力学[J]. *中国临床药理学杂志*, 2008, 24(2):126.

[9] 曾平,王彦慧,夏东亚,等.单剂量口服盐酸曲马多在维吾尔族和汉族健康受试者体内的药代动力学研究[J]. *中国药物应用与监测*, 2008, 5(6):49.

HPLC法同时测定人血浆中拉米夫定、齐多夫定和奈韦拉平的浓度^Δ

邹尚荣^{1*}, 李燕青¹, 周波¹, 简凤璧¹, 陈谐捷² (1.广州市第八人民医院药剂科, 广州 510060; 2.广州市第八人民医院感染科, 广州 510060)

中图分类号 R969.1; R512.91 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)18-1665-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.18.11

摘要 目的: 建立能同时测定人血浆中拉米夫定(3TC)、齐多夫定(AZT)和奈韦拉平(NVP)浓度的方法。方法: 血浆用乙腈沉淀处理后, 以乙酸乙酯提取后进行高效液相色谱法测定。色谱柱为Agilent XDB-C₁₈, 流动相为乙腈-水溶液(梯度洗脱), 流速为0.8 ml/min, 检测波长为268 nm, 柱温为30 ℃, 内标为甲硝唑。结果: 3TC、AZT、NVP血药浓度分别在0.05~10 μg/ml($r=0.9981$)、0.05~10 μg/ml($r=0.9990$)、0.1~20 μg/ml($r=0.9993$)范围内线性关系良好, 定量限分别为0.05、0.05、0.1 μg/ml; 平均方法回收率分别为96.36%~105.84%、98.73%~101.93%、98.78%~108.07%, 日内、日间RSD<8%。结论: 本方法简便、快速、准确、灵敏, 可用于同时使用3TC、AZT和NVP的艾滋病患者的临床治疗药物监测及药动学研究。

关键词 拉米夫定; 齐多夫定; 奈韦拉平; 高效液相色谱法; 治疗药物监测

Simultaneous Determination of Lamivudine, Zidovudine and Nevirapine in Human Plasma by HPLC

ZOU Shang-rong¹, LI Yan-qing¹, ZHOU Bo¹, JIAN Feng-bi¹, CHEN Xie-jie² (1.Dept. of Pharmacy, Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou 510060, China; 2.Dept. of Infectious Disease, Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou 510060, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a sensitive and rapid method for the simultaneous determination of lamivudine (3TC), zidovudine (AZT) and nevirapine (NVP) in human plasma. METHODS: The plasma were extracted with ethyl acetate after precipitated by acetonitrile. The determination was performed on Agilent XDB-C₁₈ with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was 268 nm, and column temperature was 30 ℃. Metronidazole was used as the internal standard. RESULTS: The linear range of 3TC, AZP, NVP were 0.05-10 μg/ml ($r=0.9981$), 0.05-10 μg/ml ($r=0.9990$), 0.1-20 μg/ml ($r=0.9993$), respectively; and the limits of quantitation was 0.05, 0.05, 0.1 μg/ml respectively. the average method recovery were 96.36%-105.84%, 98.73%-101.93%, 98.78%-108.07%, respectively. The intra-day and inter-day RSD were all <8%. CONCLUSIONS: The method is simple and rapid, accurate, sensitive, and can be used for therapy drug monitoring and pharmacokinetic study of AIDS patients receiving 3TC, AZT and NVP simultaneously.

KEYWORDS Lamivudine; Zidovudine; Nevirapine; HPLC; Therapy drug monitoring

- =====
[10] 李芹, 王睿, 郭雅, 等. 中国人群细胞色素 P₄₅₀2D6 基因多态性对曲马多药代动力学的影响[J]. 中国临床药理学, 2009, 25(4): 302.
- [11] Saccomanni G, Carlo SD, Giorgi M, et al. Determination of tramadol and metabolites by HPLC-FL and HPLC-MS/MS in urine of dogs[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 53(2): 194.
- [12] Leo MD, Giorgi M, Saccomanni G, et al. Evaluation of tramadol and its main metabolites in horse plasma by high-performance liquid chromatography/fluorescence and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry techniques[J]. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2009, 23(3): 228.
- [13] 张丽娟, 余勤, 南峰, 等. HPLC-MS/MS法同时测定人血浆中曲马多和文拉法辛[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(6): 498.
- [14] Liu P, Liang S, Wang BJ, et al. Development and validation of a sensitive LC-MS method for the determination of tramadol in human plasma and urine[J]. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2009, 34(3/4): 185.
- [15] Vlase L, Leucuta SE, Imre S. Determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human plasma by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection[J]. *Talanta*, 2008, 75(4): 1 104.

(收稿日期: 2014-01-23 修回日期: 2014-02-20)

Δ 基金项目: 广东省医学科研基金立项课题(No.A2013523); 广州市医药卫生科技项目(No.201102A213157)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 临床药理学及药事管理。电话: 020-83710515。E-mail: 627bgs@163.com