

[论著]

高效液相色谱-串联质谱法测定人体尿液中曲马多的分析方法研究*

陈金^{1**} 刘晓云² 刘洋¹ 何小维^{1***} 王平²¹(华南理工大学食品科学与工程学院, 广州 510515)²(广州正孚检测技术有限公司, 广州 510663)

摘要 目的: 建立高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)定性定量检测人体尿液中曲马多的分析方法。方法: 人体尿液经液液萃取分离后, 用HPLC-MS/MS定性分析样本中的曲马多成分, 通过同位素内标法进行定量分析。从选择性、线性、精密度、回收率及稳定性等方法进行验证。结果: 该方法中曲马多的检出限为 $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 定量线性范围为 $25 - 400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 在 $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下测得日内精密度的 1.39% 和 1.42% ($n=6$); 日间精密度的 1.25% 和 1.71% ($n=6, \text{day}=5$); 在 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下测得该方法回收率分别为 96.80% 和 93.34% ($n=3$); 结论: 该方法准确、高效、灵敏、特异性好, 可用于曲马多药物滥用者尿液中该成分的定性定量分析。

关键词 尿液; 曲马多; 液液萃取; 超快速液相色谱-串联质谱

doi: 10.13936/j.cnki.cjdd1992.2019.02.006

中图分类号 O657.63; R446.12

Determination of tramadol in human urine by HPLC-MS/MS

CHEN Jin¹, LIU Xiaoyuan², LIU Yang¹, HE Xiaowei¹, WANG Ping²

¹(South China University of Technology, School of Food Science and Engineering, Guangzhou, 510515, China)

²(Guangzhou Accurate and Correct Test Company, Guangzhou, 510663, China)

Abstract *Objective:* To establish an analytical method for qualitative and quantitative detection of tramadol in human urine by HPLC-MS/MS. *Methods:* After being extracted with liquid-liquid extraction, the urine sample was determined by HPLC-MS/MS. The method was verified by selectivity, linearity, precision, recovery and stability. *Results:* The limit of detection in this method was $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; the quantitative linear range was $25 - 400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; the intra-day precision was 1.39% and 1.42% ($n=6$); the daytime precision was 1.25% and 1.71% ($n=6, \text{day}=5$); the recoveries of the method were 96.80% and 93.34% ($n=3$) respectively. *Conclusion:* The method is accurate, efficient, sensitive and specific. It can be used for qualitative and quantitative analysis in the urine of tramadol drug abusers.

Keywords urine; tramadol; liquid-liquid extraction; HPLC-MS/MS

曲马多(Tramadol)是一种非麻醉性中枢镇痛药,其在体内的代谢物O-去甲曲马多因与阿片受

体具有亲和力而具有较强的镇痛药理学活性。因此曲马多被广泛应用于治疗各种急、慢性中度至重度疼痛^[1]。但根据曲马多独特的药物学特性^[2]、临床研究^[3]以及上市后^[4]的调查表明,曲马多具有依赖和滥用的可能性,世界各地已经对曲马多的滥用信息进行密切监测^[5]。当前我国一些地区已经发生了流行性滥用与中毒现象^[6]。

* 广东省省级科技计划项目(2017A020208014)

** 第一作者: 陈金, 硕士研究生, E-mail: chenjin_cj@foxmail.com; 刘晓云, 博士研究生, E-mail: liuyunlx@163.com

*** 通信作者: E-mail: davidhxwhe@126.com

为此,建立科学有效的曲马多检测方法显得格外重要。近些年来国际上对于曲马多体内检材的研究日益增多^[7-9]。当前国内对于曲马多检测的研究主要集中在气相色谱串联质谱^[10],相对来说液相串联质谱法的研究较少。液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)凭借其分析范围广,灵敏度高,选择性好,分离能力强,自动化程度高,可直接分析不挥发性化合物,极性大、热不稳定和大分子化合物等独特优势,已经被广泛应用于药物滥用的定性、定量检测。本文拟建立选择性好、准确性强、灵敏度高的HPLC-MS/MS快速分析方法,为临床监测曲马多滥用者的血尿浓度及涉毒案件侦查提供一定的技术指导。

1 实验

1.1 实验试剂及材料

实验所用的试剂包括 Tramadol HCl (1.0 mg · mL⁻¹, cerilliant)、Tramadol-13C₃ D₃ HCl (0.1 mg · mL⁻¹, cerilliant)、乙酸铵(St. Louis, MO, USA),所有标准物质纯度均大于 99%;乙腈、甲酸、甲醇、乙醚均为 HPLC 级(Merck, Darmstadt, Germany);十水合四硼酸钠(广州化学试剂厂);本实验所用去离子水制备于 Milli-Q 超纯水系统。

1.2 实验仪器

Shimadzu ProminecneHPLC XR 超快液相色谱系统(Kyoto, Japan); Shimadzu LCMS-8040 串联四级杆质谱系统(Kyoto, Japan); ESI 电喷雾离子源和 LabSolutions LCMS 控制软件; Sorvall ST 16R 高速冷冻离心机(Thermo Fisher Scientific, Germany); 数显式多管旋涡混合器(Henry Troemner, USA); 48 位氮气吹干设备 SPEWare(Scan Pedro, CA)。

1.3 HPLC-MS/MS 分析方法

1.3.1 质谱条件 电喷雾电离-正离子模式(ESI⁺);离子源电压为 4.5 kV;离子源电流为 0.1 μA;DL 管温度为 280 °C;柱温为 40 °C;离子源温度为 450 °C;雾化器流量为 3.0 L · min⁻¹;干燥气流为 15 L · min⁻¹;碰撞气压为 230 kPa。Tramadol 及 Tramadol-13C₃ D₃ 在正离子检测方式下,采用 ESI 源,主要生成 [M + H]⁺ 准分子离子,分别为 m/z264.15 和 m/z268.15。选择性对准分子离子 [M + H]⁺ 进行产物离子扫描,获得 Tramadol 的主要碎片为 m/z58.15 和 m/z42.15,用于定性分析;其中 m/z58.15 响应较强,作为多反应监测(MRM)的定量离子,用于定量分析。Tramadol-13C₃ D₃ 的主要碎片离子为 m/z42.30,将 m/z42.30 作为定量分析时的监测离子。详见表 1 和图 1。

表 1 曲马多的 HPLC-MS/MS 条件

化合物	母离子	子离子	Q1 (V)	CE	Q3 (V)	驻留时间(ms)
Tramadol	264.15	58.15	-23.0	-22.0	-23.0	50
		42.15	42.15	-55.0	-16.0	50
Tramadol-13C ₃ D ₃	268.10	42.30	-18.0	-55.0	-18.0	50

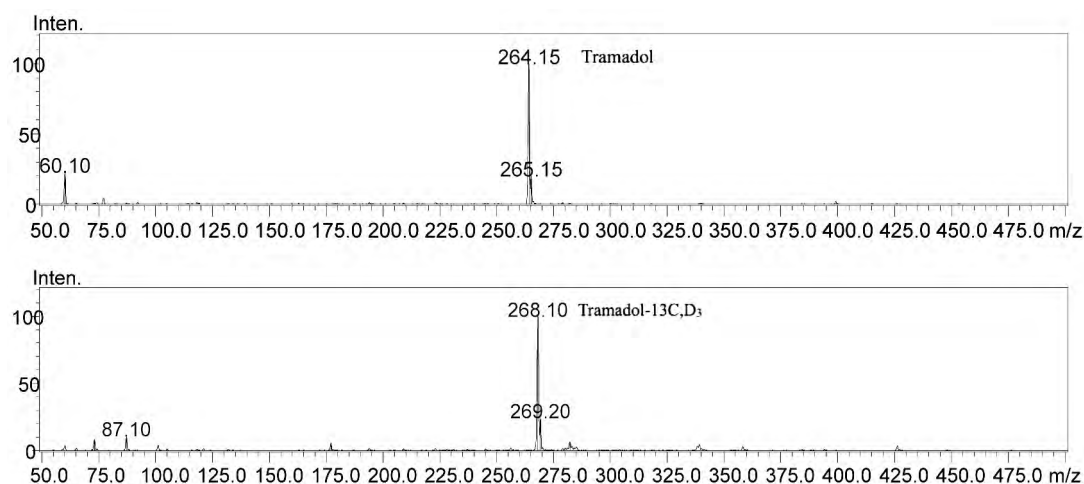


图 1 Tramadol 和 Tramadol-13C₃ D₃ 准分子离子全扫描质谱图

1.3.2 色谱条件 Gemini 色谱柱(150 × 3 mm 5 μm), 柱前接 RRLC 在线过滤器(Agilent, Germany)。梯度洗脱, 详见表 2。缓冲液为 20 mmol · L⁻¹ 乙酸铵加 0.1% 甲酸混合溶液, 流速为 0.35 mL · min⁻¹, 进样量 5.0 μL。在该条件下, Tramadol 及 Tramadol-13C₃ 的保留时间分别是 6.473 min 和 6.440 min。

表 2 曲马多尿液梯度洗脱程序

时间(min)	缓冲液(%)	甲醇(%)
6	95	5
9.5	95	5
9.51	10	90
14	0	0

1.4 样品前处理

取 100 μL 样本, 加入 2 mL 0.01 mol · mL⁻¹ 硼酸钠缓冲液后, 加入 3 mL 乙醚提取液, 涡旋震荡 30 s, 于 5000 rpm 离心 5 min, 取乙醚层吹干。往残留物加入 100 μL 乙腈 - 缓冲液复溶, 缓冲液由 20 mmol · L⁻¹ 乙酸铵加 0.1% 甲酸混合溶液配制而成。待上机分析。

2 方法验证

根据国际上生物样本色谱分析方法验证的指导原则^[11] 进行方法学验证。考察内容包括特异性、最低检出限、定量曲线、稳定性(室温 24 h)、回收率、精密度和准确度、基质效应。

2.1 特异性检测

取 9 份阴性尿液空白基质, 其中 6 份样本不添加任何药物, 2 份添加内标配成阴性样本, 1 份添加内标以及常见药物, 包括吗啡、冰毒、大麻、美沙酮、巴比妥等 120 种临床干扰药物, 按前面所述方法进行处理后, 待上机分析, 测试该方法的特异性。

2.2 最低检出量及标准曲线绘制

取阴性空白尿液为基质, 加入曲马多标准品, 配制成 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 ng · mL⁻¹ 等系列浓度样本, 按前面所述方法进行处理后, 待上机分析, 以 S/N > 3 计, 确定该方法的低检出量(LOD)。

以阴性尿液为基质, 配制曲马多标准使用液。分别配置浓度系列为 0、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 ng · mL⁻¹ 的标准点, 加入 20 μL 1 μg · mL⁻¹

Tramadol-13C₃ 内标。以浓度为横坐标, 待测物浓度的响应值与内标物响应值的比值作为纵坐标绘制一元线性方程, 计算回归方程及相关系数。连续 5 天内做平行重复测试, 计算 5 天标准曲线的斜率、截距及相关系数的变异系数(CV, %)。若连续 5 天内测定的标准曲线的斜率、截距及相关系数的变异系数 ≤ 5%, 且相关系数大于 98%, 则满足要求。

2.3 精密度和准确度

取阴性空白基质, 配制浓度分别为 60.0 ng · mL⁻¹ 和 300.0 ng · mL⁻¹ 的标准添加样本, 在同一天每个浓度配制 6 个样本, 测定方法日内精密度; 连续 5 d, 分别配制 60.0 ng · mL⁻¹ 和 300 ng · mL⁻¹ 两浓度标准添加样本, 测定方法的日间精密度和准确度。精密度用变异系数(CV, %)表示, 准确度用相对误差(CE, %)表示。若日内、日间精密度和准确度均小于 5%, 则满足要求。

2.4 稳定性、回收率和基质效应

选择浓度为 50 ng · mL⁻¹ 和 200 ng · mL⁻¹ 的标准添加样本, 做 3 个平行的添加回收率测试, 分别测定当天及室温放置 24 h 后的样本浓度值, 确认方法在 24 h 内的稳定性, 若测试值的变异系数均小于 5%, 则满足要求。

取空白基质, 配制浓度分别为 50 ng · mL⁻¹ 和 200 ng · mL⁻¹ 的三个平行标准添加样本, 按照以下方法评估该方法的回收率(ER)和基质效应(ME): 在样本前处理前添加标准品(R_{ES})、样本经过液液提取后, 添加标准品于提取后的乙醚层中(R_{PES})、以流动相为基质直接添加标准品(R_{NES})。按照下列公式计算样本前处理回收率及基质干扰率。

$$\text{萃取回收率(ER)} = (R_{ES}/R_{PES}) \times 100\%$$

$$\text{生物基质影响因素(ME)} = [(R_{PES}/R_{NES}) - 1] \times 100\%$$

2.5 临床阳性样本

收集曲马多滥用者尿液样本 2 例, 按照 1.4 所描述的前处理方法检测实际样本中曲马多的浓度。

3 结果与讨论

3.1 特异性验证

通过比较不加入任何药物、加入内标物 Tramadol-13C₃、加入内标物 Tramadol-13C₃ 及混合干扰药物(包含除 Tramadol、Tramadol-13C₃

D₃外的 100 余种常见药物) 和添加有目标物及内标的阴性基质的色谱图。结果显示,目标物及内标的出峰处没有明显干扰。图 2 是阴性尿液基质的总离

子流图,图 3 是阴性尿液中添加目标分析物的总离子流图,图 4 是阴性尿液中添加内标及混合干扰物的总离子流图。

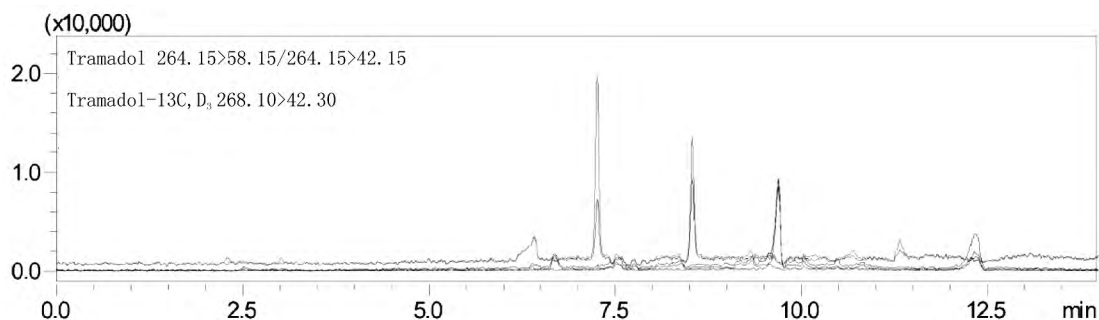


图 2 阴性尿液基质总离子流图

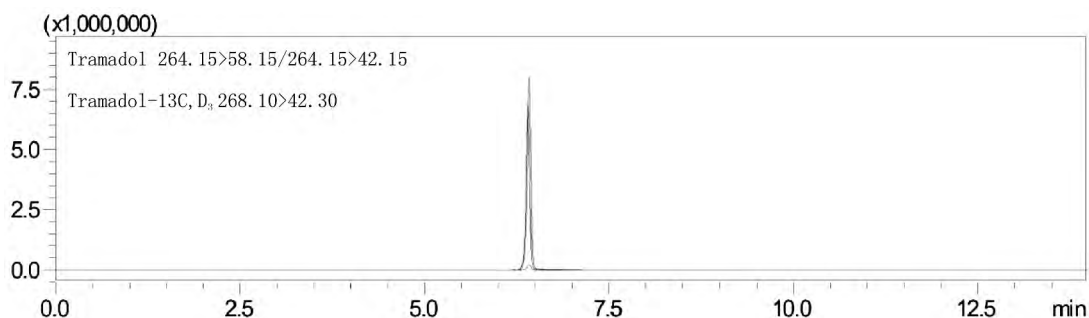


图 3 含目标分析物的阴性尿液总离子流图

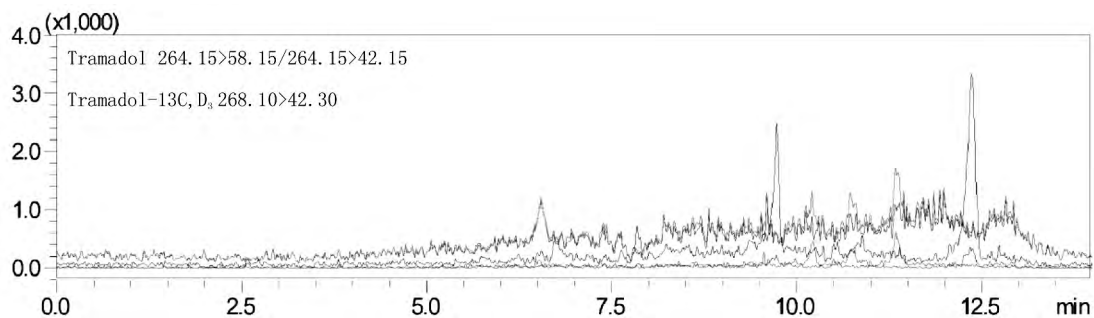


图 4 加入混合干扰药物的阴性尿液总离子流图

在该分析条件下,Tramadol 及 Tramadol - 13C , D₃ 的保留时间分别是 6.473 min 和 6.440 min。结果表明,该方法具有较强的特异性,不受尿液基质以及常见药物的干扰。

3.2 最低检出限及定量曲线

对浓度为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 ng · mL⁻¹ 5 个水平的加标样本,按照前面所描述的方法进行检测。结果显示,浓度为 1 ng · mL⁻¹ 样本 S/N ≥ 3,且浓度

在 1 ng · mL⁻¹ 以下的样本特征离子峰不明显,且 S/N ≤ 3。因此,该方法的最低检出量为 1 ng · mL⁻¹。

以 Tramadol 及 Tramadol - 13C , D₃ 的峰面积之比作为纵坐标,浓度为横坐标,绘制定量标准曲线。连续 5 天测定该曲线的斜率、截距以及相关系数的变异系数分别为 0.93%、4.22%、0.056%,且线性相关系数大于 99%。验证结果表明,该方法定量线性关系和变异系数均满足定量分析的要求,其定量曲线可以用临床样本的定量分析。

3.3 精密度和准确度测试结果

分别对浓度为 $60.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 $300.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准添加样本进行日内精密度和日间精密度的检测。 $60.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 $300.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样本的日内精密度(CV%)分别为 1.39% 和 1.42%, 准确度分别为 101.17% 和 100.28%; 日间精密度(CV%)分别为 1.25% 和 1.71%, CV% 均小于 5%。验证结果显示,该方法满足曲马多临床样本定量检测分析对于精密度和准确度的要求,详见表 3。

表 3 尿样中曲马多精密度和准确度测试结果

样品	日内精密度		日间精密度	
	60	300	60	300
	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	60.68	306.82	61.18	299.40
2	60.77	299.31	62.44	300.66
3	61.56	303.56	60.70	300.83
4	61.70	302.31	61.00	301.05
5	59.93	294.67	60.49	289.15
6	59.59	298.34		
平均值	60.70	300.83	61.16	298.22
准确度(%)	101.17	100.28		
精密度(CV%)	1.39	1.43	1.25	1.71

3.4 稳定性、回收率及基质效应测试结果

分别测定浓度为 $50.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 $200.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准添加样本在三种不同条件下的浓度值,结果显示,样本前处理的回收率在 96.8% - 97.84% 范围内,基质干扰小于 $\pm 5\%$ 。检测方法的回收率及基质干扰均满足曲马多定量检测的要求。详见表 4。

$50.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 $200.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的标准添加样本在室温放置 24 h 后的测试值与当天测试值得变异系数分别是 2.39% 和 1.85%, 均小于 5%。说明该方法 24 h 内稳定性好。详见表 5。

3.5 实际样本检测

收集曲马多滥用者尿液 2 例,测试得其尿液中的浓度分别为 $717.55 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以及 $970.68 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 实验表明该方法适用于分析药物滥用者尿液中的曲马多成分。

表 4 曲马多预处理法回收率及生物基质影响测试结果

前处理方法	平均浓度	
	$50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (n=3)	$200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (n=3)
萃取样本(R_{ES})	51.38	208.48
后萃取样本(R_{PES})	53.07	213.09
直接添加样本(R_{NES})	54.79	215.05
萃取回收率(%) (R_{ES}/R_{PES}) $\times 100$	96.8	97.84
基质影响率(%) [R_{ES}/R_{NES}] $^{-1}$ $\times 100$	-3.13	-0.91

表 5 尿液样本中曲马多稳定性测试结果

样本	当天测试		室温放置 24 h 后测试	
	$50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
1	49.52	203.34	50.06	207.76
2	48.51	190.36	50.17	200.34
3	51.45	202.86	56.86	196.77
平均值	49.83	198.85	52.36	201.62

4 讨论

4.1 前处理方法优化

生物样品常见的前处理方法有:固相萃取法、液液萃取法及蛋白沉淀法等。由于本实验的检材为尿液,首选液液萃取法。本实验以响应信号及峰面积为指标,共考察了不同提取试剂甲醇、乙醚及乙酸乙酯对曲马多及其内标物提取效果的影响。其中乙醚以及乙酸乙酯的提取效果较好。但是在相同条件下,乙醚氮吹干所需的时间远小于乙酸乙酯,故本实验采用乙醚作为提取试剂。

4.2 色谱条件优化

本实验考察了以乙酸铵和含 0.1% 甲酸的乙酸铵作为水相对曲马多及其内标物出峰的影响,发现带酸的乙酸铵作为水相时,曲马多的响应强度明显强于不带酸的乙酸铵。这是由于在 ESI⁺ 模式下,水相中添加一定浓度甲酸更加助于提高曲马多及其内标物的离子化强度。故本实验采用含 0.1% 甲酸的乙酸铵作为水相。本实验采用梯度洗脱程序,对比等度洗脱程序,曲马多及其内标物在该色谱条件下出峰稳定,峰型较好。

相比于气相色谱法^[12]分析尿液当中的曲马多

成分,本方法分析时间短,所需进样分析时间仅需15 min;相对于气相色谱法^[13],该方法无需固相萃取、衍生化等繁琐步骤,操作步骤简单适用于法医毒物学领域中曲马多药物滥用者该成分的快速分析。

5 结论

验证结果表明,本文所建立的尿液中的曲马多定性定量检测分析方法简便快捷、科学有效、准确度高,能精准检测出药物滥用人群中尿液中曲马多的成分和含量,为临床诊断及毒品检测实践提供科学依据。

6 参考文献

- [1] 刘志民,张开镐. 曲马多的药理学特点及其依赖性调研[J]. 药物不良反应杂志,2007,9(2):117-120.
- [2] 张浩然,刘志民. 曲马多药物滥用现状及其管理[J]. 中国药物依赖性杂志,2014,(3):170-175.
- [3] Vickers MD, O'Flaherty D, Szekely SM, et al. Tramadol: pain relief by an opioid without depression of respiration[J]. Anaesthesia,2010,47(4):291-296.
- [4] Tramadol - four years' experience[J]. Australian Adverse Drug Reactions Bulletin,2003,22.
- [5] 逢立艳,马军丽,周立新,等. 从曲马多能否列入国际管制透视监测信息作用[J]. 中国药物警戒,2011,8(11):667-670.
- [6] 王华新,王玲,官大威,等. 曲马多中毒及其毒理作用[J]. 法医学杂志,2008,24(4):293-296.
- [7] Sheibani A, Haghpaizir N. Application of ion mobility spectrometry for the determination of tramadol in biological samples[J]. J Food Drug Anal,2014,22(4):500-504.
- [8] Meyer MR, Rosenborg S, Stenberg M, et al. First report on the pharmacokinetics of tramadol and O-desmethyltramadol in exhaled breath compared to plasma and oral fluid after a single oral dose[J]. Biochem Pharmacol,2015,98(3):502-510.
- [9] Hilal MA, Mohamed KM. Simultaneous determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human plasma using HPLC-DAD[J]. J Chromatogr Sci,2014,52(10):1186-1192.
- [10] El-Sayed AA, Mohamed KM, Nasser AY, et al. Simultaneous determination of tramadol, O-desmethyltramadol and N-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2013,926:9-15.
- [11] INDUSTRY F G F. 1994. Validation of Chromatographic Methods. Reviewer Guidance[J].
- [12] 陈园园,刘晓云,萧晓红,等. 人体尿液中曲马多的固相萃取-气相色谱-串联质谱(SPE-GC-MS)定性定量分析方法研究[J]. 中国药物滥用防治杂志,2013,19(4):190-195.
- [13] Choi H, Baeck S, Jang M, et al. Simultaneous analysis of psychotropic phenylalkylamines in oral fluid by GC-MS with automated SPE and its application to legal cases[J]. Forensic Sci Int,2012,215(1-3):81-87.

收稿日期:2019-01-10

修回日期:2019-03-08