

HPLC 荧光法测定盐酸曲马多及其片剂人体生物等效性

张亮, 道毅俊, 李中东*, 张怡, 施孝金, 钟明康 (复旦大学附属华山医院药剂科, 上海 200040)

摘要: **目的** 建立 HPLC 荧光检测法测定曲马多及活性代谢物 *O*-去甲基曲马多在血浆中的浓度, 研究曲马多片在健康人体中的药动学及生物等效性。**方法** 采用随机交叉自身对照试验设计, 20 名健康男性受试者单次 *po* 100 mg 曲马多口腔崩解片和曲马多片后, 按规定时间采集肘静脉血, 血样经液-液萃取处理, 以 0.03 mol · L⁻¹ 四硼酸钠 (含 0.5% 三乙胺, 磷酸调 pH 至 4.0) - 甲醇 (75 : 25) 为流动相, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 50 °C, 荧光检测的激发波长 275 nm, 发射波长 304 nm, 测定曲马多和 *O*-去甲基曲马多的血药浓度, 并计算两制剂的主要药动学参数及相对生物利用度。**结果** 测定血浆中曲马多和 *O*-去甲基曲马多的最低检测限均为 1.0 μg · L⁻¹, 曲马多和 *O*-去甲基曲马多分别在 1.0 ~ 600.0 和 1.0 ~ 300.0 μg · L⁻¹ 内线性关系良好; 血药浓度测定的日内、日间精密度 RSD 均小于 5%; 测得曲马多口腔崩解片和曲马多片的血样中曲马多的主要药动学参数为: *t*_{max} (2.2 ± 1.0) 和 (1.9 ± 0.9) h, *ρ*_{max} (350.4 ± 66.0) 和 (339.0 ± 73.2) μg · L⁻¹, *t*_{1/2} (6.9 ± 1.8) 和 (6.8 ± 1.8) h, AUC₀₋₄ (3 953 ± 1 550) 和 (3 703 ± 1 310) μg · h · L⁻¹; 血样中 *O*-去甲基曲马多的主要药动学参数为: *t*_{max} (3.4 ± 1.7) 和 (3.0 ± 1.5) h, *ρ*_{max} (51.5 ± 20.7) 和 (50.2 ± 19.4) μg · L⁻¹, *t*_{1/2} (7.8 ± 2.0) 和 (7.5 ± 1.8) h, AUC₀₋₄ (744 ± 200) 和 (691 ± 141) μg · h · L⁻¹; 曲马多口腔崩解片的相对生物利用度以曲马多计算为 (106.4 ± 16.4)%, 以 *O*-去甲基曲马多计算为 (107.5 ± 17.2)%。**结论** 建立的 HPLC 荧光法灵敏、准确; 测定结果经统计学分析曲马多口腔崩解片和曲马多片为生物等效制剂。

关键词: 盐酸曲马多; *O*-去甲基曲马多; 高效液相色谱法; 人体生物等效性

中图分类号: R945.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-2494 (2008) 13-1011-04

Determination of Tramadol in Human Plasma by HPLC with Fluorescence Detection and Its Application to Bioequivalence Study

ZHANG Liang, DAO Yi-jun, LI Zhong-dong*, ZHANG Yi, SHI Xiao-jin, ZHONG Ming-kang (Department of Pharmacy, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a HPLC-fluorescence method for determining tramadol (TMD) and the active metabolite *O*-demethyltramadol (ODT) in human plasma and to study pharmacokinetics and relative bioavailability of tramadol tablets in healthy Chinese volunteers. **METHODS** A single dose of 100 mg tramadol orally disintegrating tablet and reference tramadol tablet was given to 20 healthy male volunteers according to a randomized cross-over design. The concentration of TMD and ODT in plasma was determined by HPLC with fluorescence detection after liquid-liquid extraction. A reverse phase C₁₈ column (Diamonsil, 4.6 mm × 200 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was borax buffer (0.03 mol · L⁻¹, containing 0.5% triethylamine, pH 4.0) - methanol (75 : 25), and was delivered at 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was maintained at 50 °C. Fluorescence detection wavelength was set at 275 nm (excitation) and 304 nm (emission). The pharmacokinetics and bioavailability were studied. **RESULTS** The linearity of TMD and ODT were 1.0 ~ 600.0 and 1.0 ~ 300.0 μg · L⁻¹, respectively. The quantity limit of TMD and ODT both were 1.0 μg · L⁻¹. Intra- and inter-day precisions were both less than 5%. The TMD pharmacokinetic parameters of tested and reference tablet were *t*_{max} (2.2 ± 1.0) and (1.9 ± 0.9) h, *ρ*_{max} (350.4 ± 66.0) and (339.0 ± 73.2) μg · L⁻¹, *t*_{1/2} (6.9 ± 1.8) and (6.8 ± 1.8) h, AUC₀₋₄ (3 953 ± 1 550) and (3 703 ± 1 310) μg · h · L⁻¹. The ODT pharmacokinetic parameters of tested and reference tablet were *t*_{max}

REFERENCES

- [1] KURAMOTO K, ICHIKAWA S, HIRAI A, et al. Azelnidipine and amlodipine: a comparison of their pharmacokinetics and effects on ambulatory blood pressure [J]. *Hypertens Res*, 2003, 26 (3) : 201-208.
- [2] HE Y H. Antihypertensive agent-azelnidipine [J]. *World Clin Drugs* (世界临床药物), 2004, 25 (10) : 636-636.

- [3] SUN J R, ZHANG H L, ZHANG D L. New type of antihypertensive agent azelnidipine [J]. *Qilu Pharm Aff* (齐鲁药事), 2005, 24 (3) : 190-190.
- [4] YANG J, WANG G J, LIU X Q, et al. Development of bioavailability program package 2.0 [J]. *Chin J Clin Pharm* (中国临床药理学杂志), 2003, 19 (2) : 125-127.
- (收稿日期: 2007-07-25)

作者简介: 张亮, 女, 硕士, 药师 * 通讯作者: 李中东, 男, 副主任药师, 硕士生导师 Tel: (021) 52889999 E-mail: cathyzhzhangliang@yahoo.com.cn

(3.4 ± 1.7) and (3.0 ± 1.5) h, $\rho_{\max}$ (51.5 ± 20.7) and (50.2 ± 19.4) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $t_{1/2}$ (7.8 ± 2.0) and (7.5 ± 1.8) h, AUC_{0-1} (744 ± 200) and (691 ± 141) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$. The relative bioavailability of tested to reference tablets calculated by TMD and ODT was (106.4 ± 16.4)% and (107.5 ± 17.2)% respectively. **CONCLUSION** A sensitive and accurate HPLC method was developed. The comparative bioequivalence study demonstrate that the two preparations are bioequivalent.

KEY WORDS: tramadol hydrochloride; *O*-desmethyltramadol; HPLC; bioequivalence

盐酸曲马多 (tramadol hydrochloride, TMD) 是非阿片类中枢性镇痛药。其主要作用于阿片受体; 抑制神经元突触对去甲肾上腺素的再摄取; 增加神经元外 5-羟色胺的浓度, 从而影响痛觉传递发挥镇痛作用。TMD 用于各种中、重度急慢性疼痛, 疗效确切, 药物耐受性和依赖性发生率低。目前国内外同时测定人血浆中 TMD 及其活性代谢物 *O*-去甲基曲马多 (*O*-Desmethyltramadol, ODT) 的方法有 HPLC 荧光检测法和 LC-MS/MS 法^[1-3]。本试验采用 HPLC 荧光检测法对血浆中 TMD 及其代谢物 ODT 的浓度进行了测定, 考察了 TMD 片和 TMD 口腔崩解片的药动学和生物等效性, 为临床用药提供依据。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

受试制剂: TMD 口腔崩解片 (规格 50 mg, 批号 DV040501, 上海爱的发制药有限公司); 参比制剂: TMD 片 (奇迈特, 规格 50 mg, 批号 041203, 石药集团欧意药业有限公司)。对照品: TMD 对照品 (上海爱的发制药有限公司, 含量 >99%); ODT 对照品 (Toronto Research Chemicals Inc., 含量 >98%, 批号 1-SHG-84-1)。内标物: 美托洛尔 (上海市药品生物制品检定所, 含量 >99%, 批号 10084-0101)。试剂: 甲醇为色谱纯, 乙醚、硼砂、硼酸、硫酸为分析纯, 水为超纯水。

1.2 仪器与材料

Waters2695 高效液相色谱仪及 Waters 2475 荧光检测器 (美国 Waters 公司); Millennium³²液相色谱工作站 (瑞士 Mettler Toledo); WinNonlin 统计软件 (Pharsight Corp, USA)。

1.3 试验对象

20 名健康男性志愿者, 年龄 (22.0 ± 1.6) 岁, 身高 (171.8 ± 4.6) cm, 体重 (65.8 ± 4.3) kg, 试验前经病史询问和体格检查, 心电图、肝肾功能及血尿常规均正常, 试验前 2 周及试验期间禁用任何其他药物并禁烟酒, 避免剧烈运动, 取样期间进统一标准餐。试验方案经医学伦理委员会批准, 所有受试者均了解本试验的目的和要求, 并自

愿签署知情同意书。

1.4 给药方案和血样采集

采用两制剂两周期自身交叉试验设计, 20 名受试者随机分配至 2 组, 每组各 10 人。分别服用受试制剂和参比制剂。试验前 1 d 入住试验病房, 禁食 12 h, 200 mL 温开水送服 100 mg TMD 口腔崩解片和 TMD 片, 于服药后 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 16.0, 24.0, 36.0 h, 静脉取血 5 mL, 置肝素化试管中, 离心 10 min (4 000 r · min⁻¹), 分离血浆, 于 -20 °C 冰箱保存待测。1 周后交叉服药, 重复试验。

1.5 血浆中 TMD 和 ODT 的测定

1.5.1 溶液配置 精密称取 TMD 对照品 10.00 mg, 加甲醇稀释至 10.00 mL, 得标准贮备液 (1 g · L⁻¹), 并加水稀释为 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 mg · L⁻¹ 系列浓度的标准工作液; 精密称取 ODT 对照品 1.00 mg, 加甲醇稀释至 10.00 mL, 得标准贮备液 (100 mg · L⁻¹), 并加水稀释为 0.1, 0.5, 10.0, 50.0 mg · L⁻¹ 系列浓度的标准工作液; 精密称取美托洛尔 10.00 mg, 加甲醇稀释至 10 mL, 得标准贮备液 (1 g · L⁻¹), 加水稀释为 14 mg · L⁻¹ 的内标工作液; 流动相缓冲液: 去离子水配制, 0.03 mol · L⁻¹ 四硼酸钠 (Na₂B₄O₇ · 10H₂O), 加入 0.5% 三乙胺, 用磷酸调 pH 至 4.0, 水性微孔滤膜, 真空抽滤。上述溶液均放置 4 °C 冰箱保存。

1.5.2 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm)。流动相: 流动相缓冲液 (0.03 mol · L⁻¹ 四硼酸钠, pH 4.0) - 甲醇 (75 : 25), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 50 °C。荧光检测波长: 激发波长 λ_{ex} = 275 nm, 发射波长 λ_{em} = 304 nm。

1.5.3 血浆样品的预处理 精密吸取血浆 1.0 mL 置 15 mL 聚丙烯塑料离心管中, 加入内标工作液 25 μL , 涡旋 10 s, 加硼酸缓冲液 0.5 mL (pH 12.4), 涡旋 30 s, 加入乙醚 5 mL, 涡旋 1 min, 离心 (10 °C, 5 500 r · min⁻¹) 10 min。用玻璃吸管移取上层乙醚于另一干净的 15 mL 试管内, 加入

0.05 mol · L⁻¹硫酸 150 μL，涡旋 1 min，离心（10℃，5 500 r · min⁻¹）10 min，弃去上层乙醚，取下层溶液 80 μL 进样。

1.5.4 标准曲线的制备 精密量取适量空白血浆和 TMD，OTD 对照品溶液，得到 TMD 和 OTD 质量浓度分别为 1，10，50，100，300 和 600 μg · L⁻¹ 和 1，5，25，50，150 和 300 μg · L⁻¹ 的模拟血浆样品，涡旋混匀。-20℃，避光储存。取模拟血浆样品，按“1.5.3”项下的方法操作，每一浓度进行双样本分析，记录色谱图。分别以 TMD 和 OTD 峰高与内标峰高的比例对应各自的浓度进行加权线性回归（权重 1/X），结果表明，TMD 血药浓度在 1.0 ~ 600.0 μg · L⁻¹ 内有良好线性关系（*r*=0.998 6），OTD 血药浓度在 1.0 ~ 300.0 μg · L⁻¹ 内有良好线性关系（*r*=0.998 3）。TMD 和 OTD 的最低定量限均为 1.0 μg · L⁻¹（信噪比≥5）。

1.6 分析方法的确证

1.6.1 方法专属性 在“1.5.2”色谱条件下测得的色谱图，见图 1。TMD，OTD 和美托洛尔（内标物）的保留时间分别为 14.3，5.9 和 16.0 min。经过 HPLC 荧光分析，确认在 TMD，OTD 和美托洛尔的这 3 个出峰位置处均无内源性杂质的干扰。说明本试验的样品预处理过程中，能有效地去除血浆中的内源性杂质，保证了样品测定的灵敏度和准确度。

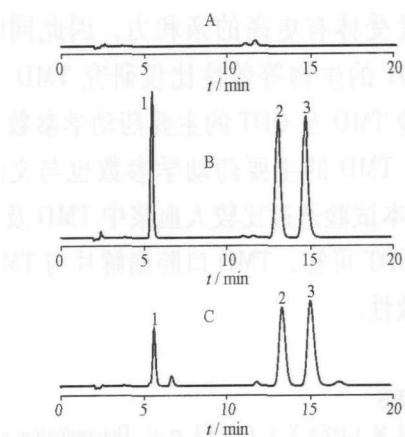


图1 盐酸曲马多（TMD）和O-去甲基曲马多（ODT）血浆样品的 HPLC 图

A - 空白血浆；B - 质控血浆；C - 服药后 3 h 血浆；1 - ODT；2 - 盐酸曲马多；3 - 内标

Fig. 1 HPLC Chromatograms of tramadol hydrochloride (TMD) and O-desmethyiltramadol (ODT) in plasma

A - blank plasma; B - quality control plasma; C - a plasma sample 3 h after a single oral dose of 100 mg TMD; 1 - ODT; 2 - TMD; 3 - internal standard

1.6.2 方法精密度 精密量取适量空白血浆和 TMD、OTD 对照品溶液，得到 TMD 和 OTD 质量浓

度分别为 2，250 和 500 μg · L⁻¹ 和 2，120 和 250 μg · L⁻¹ 的质量控制（QC）血浆样品，按“1.5.3”项下的方法操作，每一浓度进行 6 样本分析，连续测定 3 d，根据当日的标准曲线，计算 QC 样品的测得浓度。根据 QC 样品测定结果计算方法的日内、日间精密度，用 RSD（%）表示。结果见表 1。

表1 血浆样品中 TMD 及 OTD 日内及日间精密度 . *n* = 6, $\bar{x} \pm s$

Analyte	Added /μg · L ⁻¹	Intra-day precision		Inter-day precision	
		Found/μg · L ⁻¹	RSD/%	Found/μg · L ⁻¹	RSD/%
TMD	2	2.19 ± 0.04	1.98	2.23 ± 0.06	2.47
	250	225.2 ± 1.78	0.79	233.5 ± 10.26	4.39
	500	457.7 ± 4.58	1.00	457.5 ± 8.14	1.78
ODT	2	2.08 ± 0.10	4.68	2.00 ± 0.11	5.47
	120	134.8 ± 1.51	1.12	133.4 ± 5.75	4.31
	250	237.0 ± 2.83	1.19	242.8 ± 7.87	3.24

1.6.3 回收率试验 低、中、高 3 个质量浓度的 QC 标准血样按“1.5.3”项下的方法操作，每一浓度进行 6 样本分析，根据当日的标准曲线，计算 QC 样品的测得浓度。测得浓度与理论配制浓度的比值即为方法回收率。结果见表 2。

表2 血浆样品中 TMD 及 OTD 的回收率 . *n* = 6, $\bar{x} \pm s$

TMD			ODT		
Added /μg · L ⁻¹	Recovery /%	RSD /%	Added /μg · L ⁻¹	Recovery /%	RSD /%
2	111.25 ± 2.75	2.47	2	99.94 ± 5.53	5.53
250	93.42 ± 4.10	4.39	120	111.18 ± 4.79	4.31
500	91.49 ± 1.63	1.78	250	97.11 ± 3.15	3.62

1.6.4 血浆样品稳定性试验 取低、中、高 3 个质量浓度的 QC 标准血样，于 -55℃ 储存，分别在低温储存前，第 0，1，4 月时，以及经过 3 个冷冻-解冻循环后测定，结果表明，血浆样品具有良好稳定性。低、中、高 3 个质量浓度的 QC 标准血样按“1.5.3”项下的方法操作，将进样溶液放入全自动进样器中，分别在 0，24，48 h 测定，结果表明，血浆处理后样品具有良好稳定性。

1.6.5 血浆样品测定与质量控制 测定血浆样品时，每天建立一条标准曲线，并随行测定低、中、高 3 个质量浓度（双样本）的 QC 样品。根据当日标准曲线，求算 QC 样品和未知样品的浓度，当 QC 样品 RSD ≤ 15% 时，当日数据方可接受。

1.6.6 数据处理方法 采用梯形法计算 AUC₀₋₄ 值

和 $AUC_{0-\infty}$ 值;以半对数作图法,由消除相的浓度点计算 $t_{1/2}$; t_{max} 和 ρ_{max} 采用实测值。根据受试制剂和参比制剂中 TMD 和 ODT 的 AUC_{0-t} 计算相对生物利用度,并对所得数据进行方差分析和双单侧检验,90%可信限考察。

2 结果

2.1 血样测定结果

20 名健康受试者单次 po 100 mg TMD 后的 TMD 和 ODT 平均血药浓度-时间曲线见图 2。由图 2 可以看出,受试制剂和参比制剂血浆中实测 TMD 和 ODT 的浓度范围均在本试验的线性范围内。

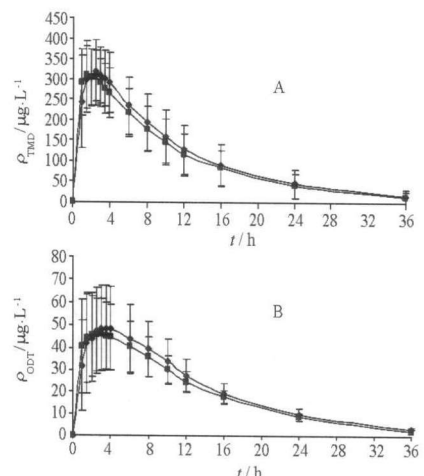


图2 20 名受试者 po 2 种制剂后 TMD 和 ODT 的平均血药浓度-时间曲线
A - 盐酸曲马多; B - O-去甲基曲马多; ◆ - 受试制剂; ■ - 参比制剂

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of TMD and ODT in 20 healthy volunteers after oral administration of two formulations
A - TMD; B - ODT; ◆ - test; ■ - reference

2.2 药动学参数

将 20 名受试者 poTMD 受试制剂和参比制剂 100 mg 后 TMD 和 ODT 血药浓度-时间数据输入计算机处理,其主要药动学参数见表 3。

表3 20 名受试者单剂量 po TMD 100 mg 后 TMD 和 ODT 的主要药动学参数. n = 20, $\bar{x} \pm s$

Tab. 3 Main pharmacokinetic parameters of TMD and ODT after a single oral dose of 100 mg TMD tablets in 20 healthy volunteers. n = 20, $\bar{x} \pm s$

Parameters	Tested formulation		Reference formulation	
	TMD	ODT	TMD	ODT
$\rho_{max}/\mu g \cdot L^{-1}$	350.4 ± 66.0	51.5 ± 20.7	339.0 ± 73.2	50.2 ± 19.4
t_{max}/h	2.2 ± 1.0	3.4 ± 1.7	1.9 ± 0.9	3.0 ± 1.5
$t_{1/2}/h$	6.9 ± 1.8	7.8 ± 2.0	6.8 ± 1.8	7.5 ± 1.8
$AUC_{0-t}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	3 953 ± 1 550	744 ± 200	3 703 ± 1 310	691 ± 141
$AUC_{0-\infty}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	4 139 ± 1 780	782 ± 196	3 855 ± 1 483	720 ± 131
F/%	106.4 ± 16.4	107.5 ± 17.2		

2.3 生物等效性评价

将主要药动学参数用 WinNonlin 软件处理。对 TMD 和 ODT 的 AUC_{0-t} 值、 $AUC_{0-\infty}$ 值、 ρ_{max} 值采用双单侧 t 检验和 (1-2α) 置信区间法分析, AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ 和 ρ_{max} 均拒绝不等效假设。 t_{max} 经 Wilcoxon 非参数检验,受试制剂与参比制剂无显著差异。受试制剂 TMD 和 ODT 相比参比制剂的 AUC_{0-t} 的 90% 置信区间值为 (99.2, 111.6) 和 (99.8, 112.9); $AUC_{0-\infty}$ 值为 (99.4, 112.2) 和 (100.2, 114.3); ρ_{max} 值为 (97.6, 111.7) 和 (96.4, 109.7)。TMD 及其活性代谢物 ODT 的结果均表明 2 种制剂具有生物等效性。

2.4 不良反应观察

20 名健康受试者单剂量用药后,无明显不良反应。

3 讨论

本试验在参考文献的基础上建立了以液液萃取为血浆前处理,采用美托洛尔为内标的 HPLC 荧光检测法,具有很高的灵敏度和专属性。TMD 和 ODT 的最低定量限均为 1.0 $\mu g \cdot L^{-1}$ (信噪比 ≥ 5),与 LC-MS/MS 法相当^[3]。曲马多是个体生物利用度差异较大的一个药物,本方法线性范围与参考文献^[2-3]提供方法相比更宽,可以更好满足临床检测的需要。ODT 是 TMD 唯一的体内活性代谢产物,与阿片受体有更高的亲和力,因此同时研究 TMD 和 ODT 的生物等效性比仅研究 TMD 更有意义。本试验 TMD 及 ODT 的主要药动学参数与文献基本一致, TMD 的主要药动学参数也与文献结果接近^[2-3]。本试验通过比较人血浆中 TMD 及其活性代谢产物 ODT 可知, TMD 口腔崩解片与 TMD 片具有生物等效性。

REFERENCES

[1] ZHAO L M, CHEN X Y, CUI J J, et al. Determination of tramadol and its active metabolite O-desmethylnaltramdol in plasma and amniotic fluid using LC-MS/MS[J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39(6):458-462.
[2] YU Y, WANG N, LIU H C. Simultaneous determination of trans-tramadol and its active metabolite, O-demethyltramadol (M1), in human serum by HPLC with fluorescence detection and the pharmacokinetic study[J]. Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志), 2004, 24(6):323-325.
[3] GU Y C, FAWCETT J. Improved HPLC method for the simultaneous determination of tramadol and O-desmethylnaltramdol in human plasma[J]. J Chromatogr B, 2005, 821(2):240-243.

(收稿日期:2007-07-13)