

Luginbühl Marc (Orcid ID: 0000-0002-3111-0750)

# Автоматический высокопроизводительный анализ Трамадола и О-Десметилтрамадола в «сухих пятнах крови»

Marc Luginbühl<sup>1</sup>, Stanislava Angelova<sup>2</sup>, Stefan Gaugler<sup>1</sup>, Andreas Längin<sup>2</sup>, Wolfgang Weinmann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CAMAG, Соненматтштрассе 11, 4132 Мюттенц, Швейцария

<sup>2</sup>Институт судебной медицины Берн, Университет Берна, Бюльштрассе 20, 3012 Берн, Швейцария.

Автор для переписки: [marc.luginbuehl@camag.com](mailto:marc.luginbuehl@camag.com)

## Резюме

Всемирное антидопинговое агентство (WADA) и Международное агентство по тестированию (ITA) недавно объявили о разработке и внедрении теста методом «сухих пятен крови» (DBS) для рутинного анализа во время проведения Зимних Олимпийских и Паралимпийских игр 2022 года в Пекине. После введения запрета на использование трамадола в соревнованиях в марте 2019 года Международный союз велосипедистов (UCI) начал пилотное исследование по ручному анализу трамадола в DBS в антидопинговых целях.

В этом контексте мы представляем полностью автоматизированный метод на основе ВЭЖХ-МС/МС с автоматизированной пробоподготовкой с использованием CAMAG DBS-MS 500 для анализа трамадола и его метаболита о-десметилтрамадола в «сухих пятнах крови».

Представленный подход сводит ручное обращение в лаборатории к абсолютному минимуму, требуя лишь подготовки калибровочных и контрольных карт DBS. Этот метод был разработан, оптимизирован и валидирован перед проведением перекрестной валидации с использованием метода анализа жидкой крови с использованием аутентичных образцов из судебно-медицинской экспертизы. В процессе валидации метод показал эффективность экстракции 62%, линейность  $r^2 > 0,99$ , точность и воспроизводимость (в пределах  $\pm 15\%$  и  $\pm 20\%$  при LLOQ) для определения трамадола и О-десметилтрамадола.

*Эта статья была принята к публикации и прошла полное рецензирование, но не прошла через процесс копирайтинга, верстки, разбиения на страницы и корректуры, что может привести к различиям между этой версией и версией записи. Пожалуйста, цитируйте эту статью следующим образом doi: 10.1002/dta.2819*

Сравнение метода в жидкой крови с 26 образцами показало хорошее совпадение ( $90\pm 19\%$  для трамадола и  $94\pm 14\%$  для о-десметилтрамадола). В заключение следует отметить, что автоматизированный анализ трамадола и о-десметилтрамадола в DBS обеспечивает быстрое и точное решение для антидопингового скрининга. Он подходит для анализа с высокой пропускной способностью, имея время выполнения около 4 мин на образец.

Кроме того, при автоматизированном подходе ручное извлечение образцов становится ненужным.

Ключевые слова

Допинг, Трамадол, Сухие пятна крови, Полностью автоматический анализ

## Введение

Трамадол - это синтетический анальгетик, используемый для облегчения умеренной и тяжелой острой и хронической боли <sup>1</sup>. Препарат действует на серотонинергическую и норадренергическую ноцицепцию, в то время как его основной метаболит о-десметилтрамадол действует на опиоидный рецептор <sup>2,3</sup>. Стандартные терапевтические дозы трамадола составляют от 50 до 100 мг перорально. Трамадол следует назначать не чаще четырех раз в час с максимальной дозировкой 400 мг в сутки. При инъекции вводится начальная доза 100 мг, затем по 50 мг каждые 10-20 минут до общей дозы 250 мг <sup>4</sup>. Терапевтические уровни в крови колеблются от 0,1 до 0,8 мг/л, токсическая концентрация - от 1 до 2 мг/л, а летальная концентрация считается выше 2 мг/л. Как правило, терапевтические, токсические и летальные уровни трамадола относительно близки <sup>5</sup>. В большинстве стран трамадол является лекарством только по рецепту врача. Однако он находится в свободном доступе через интернет. Распространенными побочными эффектами, в основном в начале терапии трамаделом, являются тошнота, головокружение и рвота <sup>2</sup>.

Трамадол вызвал интерес антидопинговых агентств, потому что его применение и сопутствующие побочные эффекты для здоровья могут быть опасны для спортсменов. Наркотик находится в программе мониторинга WADA с 2012 года. Эта программа была разработана для мониторинга и выявления закономерностей неправильного использования веществ, не включенных в запрещенный список, но имеющих возможность быть вредными в спорте. В исследовании, Распространенность результатов трамадола была самой высокой в велоспорте <sup>1</sup>. С 1 марта 2019 года трамадол был запрещен UCI по медицинским показаниям во всех велосипедных дисциплинах. Этот запрет относится к тестированию в соревновании, чтобы подавить боль, вызванную физическими упражнениями. Для обеспечения соблюдения запрета проводится неинвазивное, объемное исследование «сухих пятен крови» (DBS) <sup>6</sup>.

В этом контексте мы разработали полностью автоматизированный метод ВЭЖХ-МС/МС на основе DBS для одновременного анализа трамадола и о-десметилтрамадола. Таким образом, основное внимание было уделено системе, обеспечивающей высокую пропускную способность и минимальное время выполнения работ. Автоматизация DBS анализа была реализована с помощью экстракционной системы SAMAG DBS-MS 500, соединенной с тройным квадрупольным масс-спектрометром. Успешная реализация этой комбинации для различных приложений DBS была продемонстрирована ранее <sup>7</sup>.

## Materials and methods Материалы и методы

### Реактивы и материалы

цис-трамадола гидрохлорид (1 мг/мл, свободное основание), о-Десметил-цис-трамадол (1 мг/мл, свободное основание), и соответствующие внутренние стандарты цис-трамадол-13C, D3 HCl (100 мкг/мл, свободное основание) и о -диметил-цис-трамадол-D6 (100 мкг/мл, свободное основание) были получены от Cerilliant (Раунд-Рок, Техас, США).

Для полностью автоматизированного анализа: 2-пропанол, ацетонитрил, вода и метанол были приобретены у компании Carl Roth (Karlsruhe, Германия) чистоты ultra LC-MS. Муравьиная кислота, чистоты LC-MS (ULC / MS), была приобретена у Biosolve BV (Valkenswaard, Нидерланды). В качестве DBS карточек использовали карточки BioSample TFN filter paper AutoCollect™ DBS, предоставлены (SAMAG, Швейцария).

Для ручного анализа жидкой крови: 1-хлорбутан, puriss p. a., был получен из Sigma-Aldrich (Сент-Луис, MS, США). Безводный гидрофосфат натрия был получен из компании Merck (Дармштадт, Германия). Ацетонитрил, 99,9%, для градиентной ВЭЖХ был заказан компанией Acros Organics (Geel Belgium). Муравьиная кислота, 98%, puriss p. a., был заказан из Fluka (Buchs, Швейцария). Деионизированная вода была получена с помощью системы Milli-Q производства компании Millipore (Биллерика, США).

### Приготовление DBS калибраторов и контрольных образцов

Индивидуальные калибраторы и контрольные образцы DBS готовили путем смешивания 240 мкл жидкой крови (собранной в пробирках Vacutainer от BD (Franklin Lakes, NJ, США), содержащей гепарин лития (в качестве антикоагулянта) с 10 мкл рабочего раствора стандартов, содержащего смесь трамадола и о-десметилтрамадола. После ввода добавки образцы встряхивали в течение одного часа на цифровом шейкере IKA KS 501 (Staufen, Германия), работающем при 300 об/мин, образец наносили с помощью цифровой пипетки (Socorex Acura 825). Перед анализом образцы оставляли сушиться при комнатной температуре (около 21°C) не менее трех часов.

Полностью автоматизированная экстракция образцов с DBS карточек

DBS-MS 500 (CAMAG, Швейцария) был подключен в качестве автосамплера к системе ВЭЖХ-МС Shimadzu (Киото, Япония), см. Рис.1. Экстракционный растворитель состоял из водно-метанольной смеси (90/10, об/об). Растворитель для элюирования и хроматографические условия были оптимизированы для достижения разделения до базовой линии и почти симметричной формы пика для обоих аналитов, что потребовало более высокого содержания воды для экстракции о-десметилтрамадола. Каждая карточка DBS была сфотографирована с помощью встроенной камеры до и после процесса экстракции, чтобы задокументировать анализ, проверить наличие пятна крови, настроить положение головки экстракции и проверить, где происходит экстракция. Раствор внутреннего стандарта в метаноле (объем распыления 20 мкл, содержащий 25 нг / мл цис-трамадола-13С, D3 и 10 нг/мл о-десметил-цис-трамадола-D6) распыляли на площадь около 1 см<sup>2</sup> по центру каждого пятна (скорость потока 120 мкл/мин). После этого карточку сушили в течение 60 с при комнатной температуре. В отличие от смешивания внутреннего стандарта с экстракционным растворителем, эта процедура позволяет компенсировать различия в экстракции (поправка извлечения)<sup>8,9</sup>. Экстракцию зоны диаметром 4,2-мм из центра пятна осуществляли потоком растворителя объемом 20 мкл с расходом 30 мкл/мин в петлю объемом 20 мкл Viper фирмы Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, США). После этого экстракционную ячейку и капилляры промываются с помощью встроенной промывочной станцией с использованием двух различных растворителей (растворитель 1: метанол / вода / ацетонитрил/2-пропанол 25/25/25/25, об/об/об/об в течение 45 с, растворитель 2: экстракционным раствором в течение 20 с).

Условия жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии

Система ЖХ-МС Shimadzu состоит из двух насосов Nexera LC30 AD X2, термостата колонок СТО-20АС с шестипортовым краном и смесителем из нержавеющей стали объемом 20 мкл, а также масс-спектрометра LCMS-8050, оснащенного источником электроспрейной ионизации, работающим в положительном, выбранном режиме контроля реакции (SRM) (см. таблицу I). Параметры интерфейса: расход в небулайзере 3 л/мин, расход газа для обогрева 10 л/мин, расход газа для сушки 10 л/мин. температура интерфейса 300°C, температура линии десольватации 250°C, блок нагревателя 400°C.

Хроматографическое разделение анализируемых веществ осуществляли с помощью колонки Kinetex 2.6 мкм biphenyl, 100 x 2.1 мм от Phenomenex (Torrance, CA, США) при 50°C. Колонку кондиционировали смесью 99% А (вода, содержащая 0,1% муравьиной кислоты) и 1% В (ацетонитрил, содержащий 0,1% муравьиной кислоты) со скоростью потока 0,5 мл/мин.

Градиент для аналитической колонки был следующим: с 0,1 мин до 2,0 мин %В увеличивали до 60%. От 2,0 до 2,5 мин %В увеличивали до 95% В и скорости потока до 0,75 мл/мин. Через 2,5 мин расход и состав элюента возвращали в исходные условия и выдерживали до 3,0 мин. Чтобы предотвратить загрязнение колонки использовали ультрафильтр KrudKatcher от Phenomenex, а для снижения контаминации МС выход с колонки к масс-спектрометру был активен только с 1,6-2,35 мин путем переключения 10-ти портового крана внутри термостата колонок (вид хроматограммы см. Рис. 2).

#### Валидация метода

Эксперименты по валидации метода были проведены для установления достоверности полностью автоматизированного ВЭЖХ-МС/МС метода на основе Руководства FDA по валидации биоаналитических методов для промышленности (май 2018 г.)<sup>10</sup>.

#### Чувствительность

Предел обнаружения (LOD) устанавливался в соответствии с отношением сигнал / шум  $\geq 3$  для всех контролируемых переходов (квантификатор и классификатор) и оценивался в серии разведений. Нижний предел количественного определения устанавливали в соответствии с терапевтическим уровнем трамадола в крови (0,1-0,8 мг/л) и тестировали для точного определения его концентрации с точностью и воспроизводимостью в пределах  $\pm 20\%$ <sup>11</sup>.

#### Селективность

Селективность метода была проверена путем анализа холостых образцов DBS от шести различных испытуемых (4 мужчины, 2 женщины), с добавлением и без добавления внутреннего стандарта (распылением), и сравнения их с холостыми образцами крови с добавкой на уровне нижнего предела количественного определения (25 нг/мл для трамадола и 20 нг/мл для о-десметилтрамадола).

#### Калибровка и линейность

Линейность сигнала оценивали путем анализа трамадола и о-десметилтрамадола в калибровочных образцах DBS в течение трех отдельных дней, проводя калибровку в начале и конце каждой серии. Для трамадола - восемь уровней калибровочных образцов DBS в диапазоне от 25-1000 нг / мл (25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 нг/мл) были измерены вместе с соответствующим внутренним стандартом. Для о-десметилтрамадола - семь уровней калибровочных образцов DBS в диапазоне от 20 до 400 нг / мл (20, 40, 80, 160, 240, 320 и 400 нг/мл) были измерены вместе с соответствующим внутренним стандартом. Концентрации определяли с помощью модуля анализа данных LabSolution Browser, для линейной регрессии с весом 1/x.

#### Точность и воспроизводимость

Точность и воспроизводимость определяли методом повторного анализа ( $n=6$ ) на отдельных контрольных карточках (КК) в трех различных сериях в течение трех отдельных дней.

Образцы КК трамадола измеряли на нижнем пределе количественного определения (LLOQ, 25 нг/мл), в средних (200 нг/мл) и высоких (600 нг/мл) концентрациях. Пробы КК о-десметилтрамадола анализировали при LLOQ (20 нг/мл), средней (80 нг/мл) и высокой (240 нг/мл) концентрациях. Точность определялась приближением к целевой концентрации аналита и выражалась как отклонение в %.

Воспроизводимость была выражена как коэффициент вариации (%CV) метода. Критерии приемлемости составили  $\pm 15\%$  как для точности, так и для воспроизводимости при всех концентрациях, за исключением LLOQ, где  $\pm 20\%$  являются приемлемой.

#### Матричные эффекты и подавление ионов

Влияние матричного эффекта оценивали путем введения матричных экстрактов из трех различных чистых образцов крови с добавкой растворов стандартов с получением различных концентраций трамадола (100 нг/мл и 600 нг/мл) и о-десметилтрамадола (40 нг/мл и 240 нг/мл). Каждый образец готовили в трех экземплярах путем экстрагирования одного пятна DBS объемом 20 мкл в растворе, который использовали и для DBS MS-500 (10/90, метанол/вода) в течение получаса при встряхивании при 300 об/мин на шейкере IKA KS 501. После этого экстракты упаривали насухо в нагревательном блоке при 50°C в потоке азота и перерастворяли в 500 мкл элюирующего растворителя, содержащего внутренний стандарт и аналит. Для матричного эффекта внутренняя стандартная скорректированная площадь пика аналита сравнивалась с образцами, не содержащими матрицы.

Эффекты усиления или подавления ионов исследовали путем сравнения площади пика анализируемого вещества без какой-либо коррекции внутренним стандартом. Поскольку чистый растворитель распределяется на фильтровальной бумаге по-другому, чем кровь, оценка извлечения для полностью автоматизированного метода невозможна в таком подходе, основанном на экстракции части пятна.

#### Перенос

Перенос оценивали путем анализа самого высокого калибратора в трех повторах (1000 нг/мл), за которым следовал чистый образец крови.

#### Эффективность экстракции

Эффективность экстракции проводили шестикратной экстракцией одного и того же пятна. Таким образом, общий сигнал аналита суммировался и сравнивался с интенсивностью сигнала, полученного во время первой экстракции, чтобы определить эффективность экстракции данного метода.

#### Стабильность

Стабильность образцов на DBS карточках оценивали при их хранении образцов с концентрацией 400 нг/мл, упакованных в минигрип-пакет вместе с осушителем (пакет силикагеля) в течение одного месяца при комнатной температуре и в морозильной камере при температуре -20°C. Анализ свежеприготовленных образцов DBS и образцов после хранения проводили в трех повторах.

#### Влияние гематокрита

Для оценки влияния гематокрита на анализ готовили DBS карточки с искусственными величинами гематокрита: свежесобранную чистую кровь центрифугировали (10 мин с RCF 1300) для разделения эритроцитов от плазмы. Кровь и плазму смешивали в разных пропорциях, чтобы получить последовательность с разной величиной гематокрита крови (20, 30, 40, 50, 60, и еще 70 %). После этого к образцам добавляли стандарты, чтобы получить различные концентрации трамадола (100 нг/мл и 400 нг/мл) и о-десметилтрамадола (40 нг/мл и 160 нг/мл). На DBS карточки наносили эти растворы (объем 20 мкл) и анализировали в трех повторах.

#### Влияние размера пятна

Чтобы оценить влияние размера пятна на результат анализа, в кровь вводили добавку в концентрации 200 нг/мл и наносили на DBS карточки в различных объемах (7,5 мкл, 10 мкл, 15 мкл, 20 мкл). Каждый объем пробы наносили трижды и анализировали соответственно. Рекомендация по максимальному объему нанесения на карточки AutoCollect™ DBS составляет 20 мкл.

#### Перекрестная валидация с анализом аутентичных образцов жидкой крови

В общей сложности 26 подлинных образцов, которые были признаны положительными на трамадол (>LOD и <1000 нг/мл) во время рутинной судебной экспертизы в Институте судебной медицины Берна, были нанесены на DBS карточки и проанализированы с использованием полностью автоматизированного анализа DBS для проведения перекрестной валидации. Подлинные образцы крови были получены в период с октября 2018 года по август 2019 года и проанализированы после отбора. DBS анализ всех образцов был проведен в феврале 2020 года. Перед проведением DBS анализа образцы хранились в жидком виде в морозильной камере при температуре -20°C.

Для анализа трамадола и о-десметилтрамадола в жидкой крови использовали полностью валидированный метод с пятиточечной калибровкой от 50-1000 нг/мл. Вкратце, 200 мкл крови экстрагировали 1 мл 1-хлорбутана с фосфатным буфером (pH 9, 5,0 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> в 500 мл воды) и внутренним стандартом. После встряхивания (Vortex) в течение 5 мин образец центрифугировали при 13'000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в стеклянный флакон, выпаривали насухо в нагревательном блоке при 50°C в потоке азота и вновь растворяли в 200 мкл раствора (вода/ацетонитрил, 5/95 +0,1% муравьиной кислоты).

Хроматографическое разделение осуществлялось на колонке Synergi Polar RP 4 мкм, 50 x 2,0 мм от компании Phenomenex (Torrance, CA, США) при вводе объема 20 мкл. Масс-спектрометрический анализ проводили на MS Sciex 3200 QTrap (Торонто, Канада), работающем в режиме положительного электроспрея в режиме SRM.

## Результаты

### Валидация метода

#### Чувствительность

LOD для трамадола наблюдался при 2 нг/мл, LOD для О-десметилтрамадола - при 5 нг/мл. Для обеспечения надлежащего количественного определения концентраций ниже и в пределах терапевтического диапазона при сохранении точности и воспроизводимости в пределах  $\pm 20\%$  LLOQ для трамадола был установлен на уровне 25 нг / мл, а для О-десметилтрамадола - на уровне 20 нг/мл.

#### Селективность

Анализ холостых проб DBS от шести различных испытуемых показал интенсивность шумового сигнала  $< 1000$  в области времени удерживания трамадола и  $< 250$  в области времени удерживания о-десметилтрамадола для переходов SRM 1. После добавления внутреннего стандарта наблюдались незначительные интенсивности сигнала SRM 1: для трамадола до  $2 \cdot 10^2$  отсчетов, а для О-десметилтрамадола до 600 отсчетов. Для нижней калибровочной точки величина составила  $380 \cdot 10^3$  отсчетов для трамадола и  $125 \cdot 10^3$  отсчетов для о-десметилтрамадола.

#### Калибровка и линейность

Трамадол и о-десметилтрамадол в DBS анализе показали хорошую линейную корреляцию. Затем были определены величины коэффициента детерминации ( $r^2$ ) в трех сериях: Трамадол SRM 1  $0,99398 \pm 0,00337$  (диапазон: 0,99013-0,99641), трамадол SRM 2  $0,99404 \pm 0,00285$  (диапазон: 0,9908-0,99612), о-десметилтрамадол SRM 1  $0,99196 \pm 0,00233$  (диапазон: 0,9906-0,99466), а также о-десметилтрамадол SRM 2  $0,99297 \pm 0,00147$  (диапазон: 0,99135-0,9942).

#### Точность и воспроизводимость

Точность (% отклонения) и воспроизводимость (% коэффициент вариации), определяемые по шести репликам каждого из трех различных контрольных образцов в течение трех различных дней, были оба  $< 15\%$ , за исключением нижней калибровочной точки, где величина  $< \pm 20\%$  является допустимой, см. таблицу II.

## Матричные эффекты и подавление ионов

Постэкстракционная добавка к матричным экстрактам показала, что средний матричный эффект (%ME) по сравнению с чистым раствором составил  $99\pm 3\%$  при К3 и  $96\pm 8\%$  при К6 для трамадола и  $103\pm 2\%$  при К3 и  $101\pm 5\%$  при К6 для о-десметилтрамадола. Таким образом, исследуемые матричные эффекты можно считать ничтожно малыми при учете поправки дейтерированными внутренними стандартами.

Подавление ионов исследовали путем сравнения площади анализируемого вещества без коррекции с внутренним стандартом: для трамадола наблюдался отклик  $66\pm 7\%$  при К3 и  $66\pm 7\%$  при К6, а для О-десметилтрамадола отклик был равен  $73\pm 9\%$  при К3 и  $81\pm 14\%$  при К6.

## Перенос

Определение переноса после трехкратного анализа К7 показал среднюю величину около 0,4%, что составляет 6-8 % от площади сигнала трамадола и 2-3% от площади сигнала о-десметилтрамадола, наблюдаемой на нижней точке калибровки. Анализ холостой пробы уменьшает перенос после калибратокра с самой высокой концентрацией.

## Эффективность экстракции

Эффективность экстракции определялась при высокой концентрации контрольных образцов (600 нг/мл трамадола и 240 нг / мл о-десметилтрамадола), которая составила 62% при первой экстракции и 16% при второй экстракции.

## Стабильность

После месяца хранения образцы на DBS карточках не показали никакого снижения концентрации, независимо от хранения в морозильной камере или при комнатной температуре. Средние концентрации, полученные для трамадола, составили 98% при хранении при комнатной температуре и 95% при хранении в морозильной камере. Для о-десметилтрамадола наблюдалось 97% при хранении при комнатной температуре и 90% при хранении в морозильной камере.

## Влияние гематокрита

В диапазоне 20-60% не было обнаружено изменения площади из-за гематокрита при экстракции площади пятна диаметром 4,2 мм с использованием внутреннего стандарта для двух соответствующих концентраций трамадола (100 нг/мл и 400 нг/мл) и о-десметилтрамадола (40 нг/мл и 160 нг/мл). Наблюдаемые средние концентрации, полученные при различных величинах гематокрита, хорошо согласуются с концентрациями, полученными при средней величине гематокрита 40%, см. Рис. 3. При величине гематокрита 70% наблюдалось существенное снижение измеренной концентрации. Средний размер пятна при общем объеме 20 мкл уменьшился с  $54,5 \text{ мм}^2$  при гематокрите 20% до  $45 \text{ мм}^2$  при гематокрите

70%.

#### Влияние размера пятна

По сравнению с концентрацией, полученной с пятном в 20 мкл, наименьший размер пятна, составляющий всего 7,5 мкл, показал снижение средней концентрации трамадола на  $17 \pm 12\%$  и о-десметилтрамадола на  $10 \pm 15\%$ . Пятно объемом 7,5 мкл равно диаметру всего  $5,16 \pm 0,098$  мм. Потенциально полное смачивание сверху донизу DBS бумаги по всей площади экстракции диаметром 4,2 мм уменьшается при использовании таких небольших объемов образца. Между объемами 10, 15 и 20 мкл не было обнаружено разницы в средней концентрации образца для трамадола (в пределах 3%) и о-десметилтрамадола (в пределах 6%).

Перекрестное сравнение с результатами аутентичных образцов в жидкой крови

Сравнение концентраций, полученных с помощью анализа жидкой крови и полностью автоматизированного DBS анализа показало хорошую сходимость между этими двумя методами. Для трамадола линейное уравнение регрессии для 26-ти образцов было  $y = 1,0804 X + 9,5565$  с коэффициентом детерминации ( $r^2$ ) 0,9383, см. Рис.4. 23 образца, которые находились в пределах или очень близко к диапазону калибровки для метода с жидкой кровью (в пределах 48-956 нг/мл), показали среднестатистическую сходимость  $90 \pm 19\%$ . Для о-десметилтрамадола линейное уравнение регрессии для 26 образцов было  $y = 1,0807 X + 0,0858$  с коэффициентом детерминации ( $r^2$ ) 0,9818, см. Рис.4. 9 образцов, которые находились в пределах или очень близко к диапазону калибровки для метода с жидкой кровью (в пределах 49-387 нг/мл), показали среднестатистическую сходимость  $94 \pm 14\%$ .

## Обсуждение результатов

Целью настоящего исследования является разработка метода полностью автоматизированной пробоподготовки, экстракции и ВЭЖХ-МС/МС анализа трамадола и его метаболита о-десметилтрамадола. В отличие от анализа только трамадола, представленный здесь метод имеет явное преимущество, так как наличие метаболита позволяет подтвердить положительное обнаружение трамадола в одном опыте. Автоматизированная система позволяет проводить скрининг большого числа образцов «сухих пятен крови». При времени анализа до 4-х минут она обеспечивает анализ более 300 образцов в течение 24 часов.

Обладая хорошей селективностью и чувствительностью, этот метод идеально подходит для скрининга трамадола для антидопинговых тестов. О таких антидопинговых программах для скрининга трамадола в «сухих пятнах крови» сообщалось ранее в пресс-заявлениях Международного союза велосипедистов (UCI) в сотрудничестве с Центром Исследований и экспертизой в области антидопинговых наук (REDs) из Университета Лозанны<sup>12</sup>.

Таким образом, UCI провел 143 теста на 117 гонщиках на 11 соревнованиях по календарю UCI WorldTour. Все анализы оказались отрицательными. Сбор образцов проводился с использованием системы DBS Systems sampling kits (HemaXis), однако, методические подробности процедуры анализа остаются неизвестными.

В ходе процесса аттестация метода было доказано, что автоматизированная система экстракции оказалась быстрой и надежной для работы с карточками «сухих пятен крови». Калибровка была линейной, точной и воспроизводимой. Исследования гематокрита показали минимальные различия в диапазоне от 20% до 60%. Эти незначительные различия, вероятно, связаны с распылением внутреннего стандарта, компенсирующего погрешность степени извлечения с учетом гематокрита, как сообщалось ранее в публикации Абу-Раби и др.<sup>13</sup>.

Проведя перекрестное сравнение с аутентичными образцами крови, было показано, что концентрации трамадола, определяемые полностью автоматизированной системой, сопоставимы с измерениями в жидкой крови. Однако, поскольку пробоподготовка DBS осуществляется полностью автоматически, то с помощью этого нового метода затраты на работу персонала сводятся к абсолютному минимуму. Для количественного анализа вручную готовятся только калибраторы и контрольные DBS образцы. Если анализ проводится качественно (скрининг), то никакой ручной пробоподготовки вообще не требуется. Что касается переноса до 0,4%, то мы рекомендуем провести повторный анализ положительных проб трамадола с концентрациями, близкими к нижнему пределу определения, если им предшествует проба с высокой концентрацией. Другим вариантом является экстракция чистого образца после каждого испытуемого образца крови.

Для антидопингового скрининга на трамадол вопросы переноса незначительны, поскольку положительные результаты по запрещенным веществам встречаются редко. При анализе 9851 пробы мочи, взятой в мадридской лаборатории допинг-контроля до запрета трамадола, в период с 2013 по 2017 год количество положительных результатов от трамадола составило 1,4% во всех видах спорта, причем 65,2% этих результатов были связаны с велоспортом<sup>1</sup>. Недостатком нового способа является то, что для извлечения О-десметилтрамадола требуется высокое содержание воды в экстракционном растворителе. Это связано с тем, что при слишком высоком содержании органического вещества форма пика о-десметилтрамадола искажается. Поскольку высокое содержание воды приводит к увеличению элюирования компонентов матрицы пробы, поэтому обслуживание автосамплера DBS-MS 500 требуется чаще по сравнению с экстракцией органическим растворителем.

## Заключение

Новая рабочая процедура для определения трамадола и о-десметилтрамадола с использованием метода «сухих пятен крови» был разработан, аттестован и успешно применен к аутентичным образцам. Аналитический процесс полностью автоматизирован и идеально

подходит для проведения антидопингового скрининга. Автоматизация анализа «сухих пятен крови» с помощью автосамплера DBS-MS 500 позволяет идентифицировать образец по этикетке штрих-кода на DBS карточке из данных лабораторной информационной системы (LIMS).

## Благодарности

Благодарим компанию SAMAG за поддержку данного исследования. Кроме того, мы хотели бы выразить нашу благодарность коллективу лаборатории судебной токсикологии и химии Института судебной медицины Берна за поддержку в ходе этого исследования.

## Заявление об этике анализов

Использование анонимизированного биологического материала не подпадает под действие закона Швейцарии об исследованиях человека (Art. 2 HRA). Образцы, использованные в ходе этого проекта, для определения трамадола и о-десметилтрамадола были собраны на основе применения швейцарского закона «О дорожном движении», а затем были созданы анонимизированные карты DBS. Карты DBS, проанализированные в DBS лаборатории SAMAG в Мюттенце, не могут быть приписаны конкретной персоне.

## Литература

1. Baltazar-Martins G, Plata M del M, Muñoz-Guerra J, Muñoz G, Carreras D, Del Coso J. Prevalence of tramadol findings in urine samples obtained in competition. *Drug Test Anal.* 2019. doi:10.1002/dta.2575
2. Edmundus, Pennings; Bodenschatz, Caroline; Beran D. *WHO Tramadol Update Review Report Agenda Item 6.1.*; 2014.
3. Goeringer KE, Logan BK, Christian GD. Identification of tramadol and its metabolites in blood from drug-related deaths and drug-impaired drivers. *J Anal Toxicol.* 1997. doi:10.1093/jat/21.7.529
4. Prince A (National PIS (Newcastle C. Summary for UKPID - Tramadol. Tramadol. <http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid17.htm>. Published 1997. Accessed April 1, 2020.
5. Clarot F, Goullé JP, Vaz E, Proust B. Fatal overdoses of tramadol: Is benzodiazepine a risk factor of lethality? *Forensic Sci Int.* 2003. doi:10.1016/S0379-0738(03)00100-2
6. Internationale UC. Inside UCI - Tramadol ban: All you need to know. <https://www.uci.org/inside-uci/press-releases/tramadol-ban-all-you-need-to-know>. Published 2019. Accessed April 1, 2020.
7. Luginbühl M, Gaugler S. The Application of Fully Automated Dried Blood Spot Analysis for

- Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry using the CAMAG DBS-MS 500 Autosampler. *Clin Biochem*. February 2020. doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.02.007
8. Luginbuhl M, Gaugler S. The application of fully automated dried blood spot analysis for liquid chromatography-tandem mass spectrometry using the CAMAG DBS-MS 500 autosampler. *Clin Biochem*. February 2020. doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.02.007
  9. Velghe S, Delahaye L, Stove CP. Is the hematocrit still an issue in quantitative dried blood spot analysis? *J Pharm Biomed Anal*. 2019. doi:10.1016/j.jpba.2018.10.010
  10. US-FDA. *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*.; 2018.
  11. Khan FY, Yousef H, Errayes M. Tramadol toxicity-induced rhabdomyolysis. *J Emergencies, Trauma Shock*. 2010. doi:10.4103/0974-2700.70766
  12. Union Cycliste Internationale. Misuse of tramadol: UCI report on tests carried out during the first part of the 2019 season. Inside UCI. <https://www.uci.org/inside-uci/press-releases/misuse-of-tramadol-uci-report-on-tests-carried-out-during-the-first-part-of-the-2019-season>. Published 2019. Accessed April 10, 2020.
  13. Abu-Rabie P, Denniff P, Spooner N, Chowdhry BZ, Pullen FS. Investigation of different approaches to incorporating internal standard in DBS quantitative bioanalytical workflows and their effect on nullifying hematocrit-based assay bias. *Anal Chem*. 2015. doi:10.1021/acs.analchem.5b00908

Таблица 1 Параметры, используемые для мониторинга выбранной реакции (SRM) для Трамадола и О-десметилтрамадола

Аналит	Precursor [m/z]	Product [m/z]	Dwell time [ms]	Q1 pre- bias [V]	CE	Q3 pre- bias [V]	RT [мин]
<b>Tramadol SRM 1</b>	264.1	58.25	10	-20	-17	-20	2.15
<b>Tramadol SRM 2</b>	264.1	264.1	10	-20	-5	-20	
<b>O-desmethyltramadol SRM 1</b>	250.2	58.15	10	-17	-23	-22	
<b>O-desmethyltramadol SRM 2</b>	250.2	250.2	10	-17	-5	-22	1.87
<b>Tramadol-13C, D3</b>	268.1	58.3	10	-19	-40	-23	
<b>O- desmethyltramadol- D6</b>	256.2	64.15	10	-17	-25	-27	

Таблица II Точность и ошибка внутри- и вне серии определялись в ходе трех валидационных серий с шестью контрольными образцами в каждой концентрации.

Аналит	Концентрация [нг/мл]	Intra-	Inter-	Intra-assay	Inter-assay
		assay	assay	precision	precision
		accuracy	accuracy	[%CV,n=6]	[%CV,n=3]
		[%n=6]	[%n=3]		
<b>Tramadol SRM 1</b>	25	113-118	116	1-3	2
	200	91-100	95	1-11	7
	600	93-106	98	5-6	5
<b>Tramadol SRM 2</b>	25	114-118	116	2-4	3
	200	88-92	90	4-10	7
	600	86-104	96	6-9	7
<b>O-desmethyltramadol SRM 1</b>	20	88-108	99	2-10	5
	80	87-95	91	7-11	9
	240	98-102	101	9-12	10
<b>O-desmethyltramadol SRM 2</b>	20	97-115	108	3-7	5
	80	86-95	90	7-10	9
	240	95-100	97	4-9	7

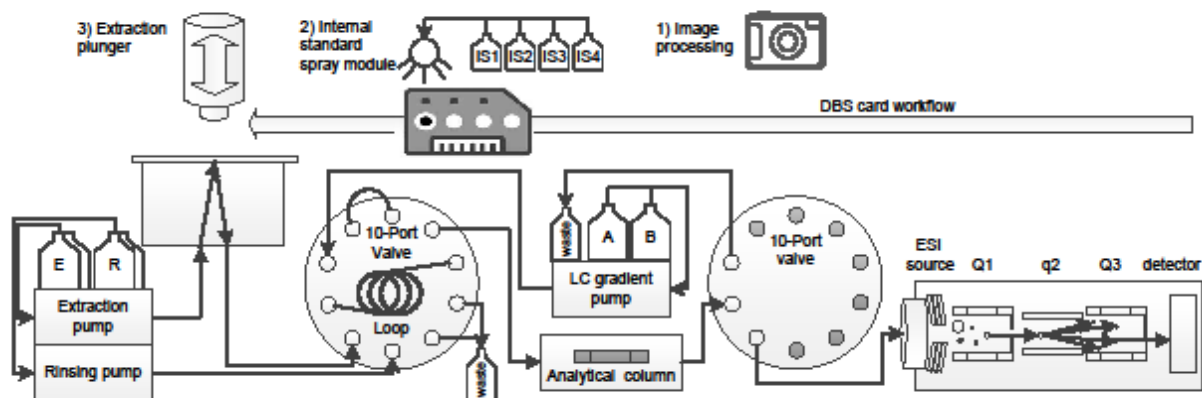


Рис 1 Схема экспериментальной конфигурации с прямым подключением SAMAG DBS MS-500 к ВЭЖХ-МС/МС системе.

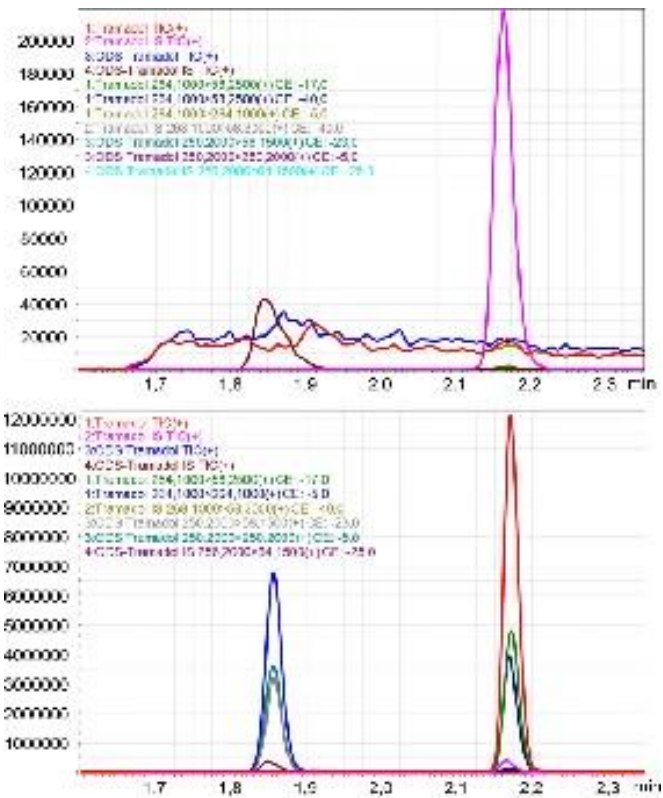


Рис. 2 На холостой образец крови распыляли внутренний стандарт, указанный на верхней панели. Образец чистой крови, опрысканный внутренним стандартом и с добавкой 200 нг/мл трамадола и 80 нг/мл о-десметилтрамадола, показаны на нижней панели.

## Hematocrit Dependency

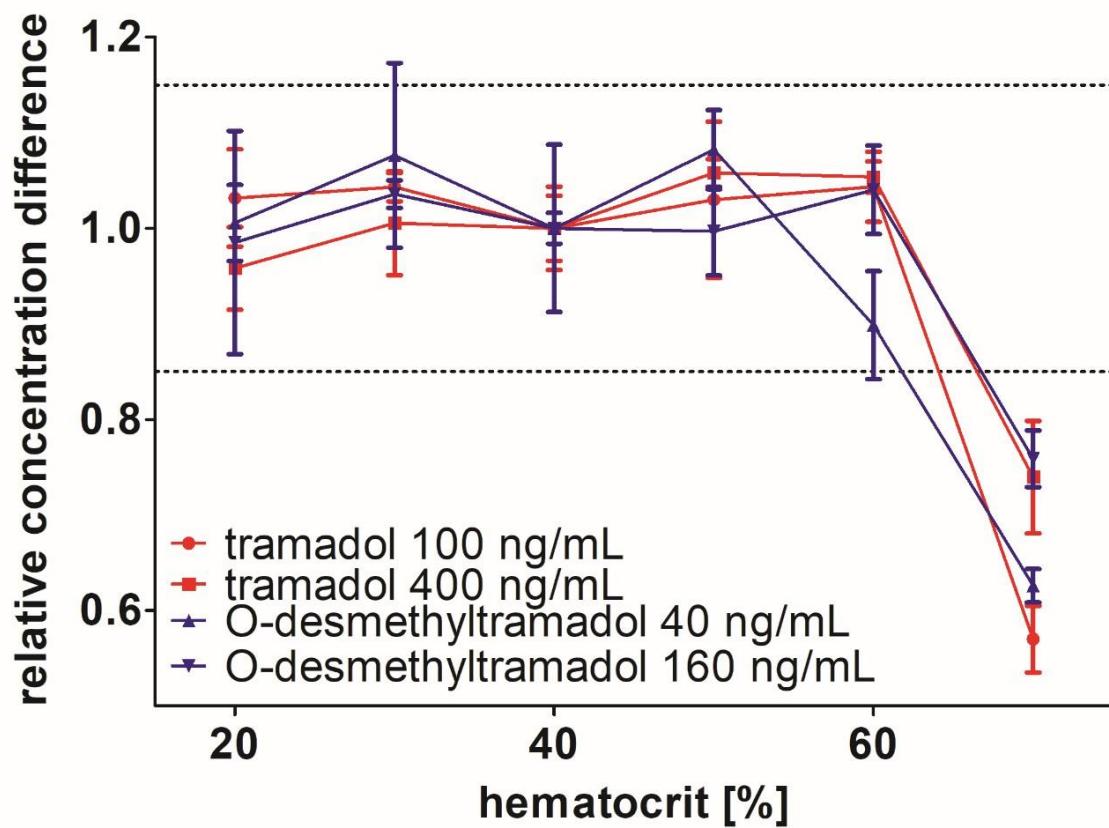


Рис 3 Зависимость результатов DBS анализа для Трамадола и О-десметилтрамадола от величины гематокрита были исследованы путем смешивания эритроцитов с плазмой. Результаты, полученные при гематокрите 40%, были установлены с относительной разницей концентраций 1,0.

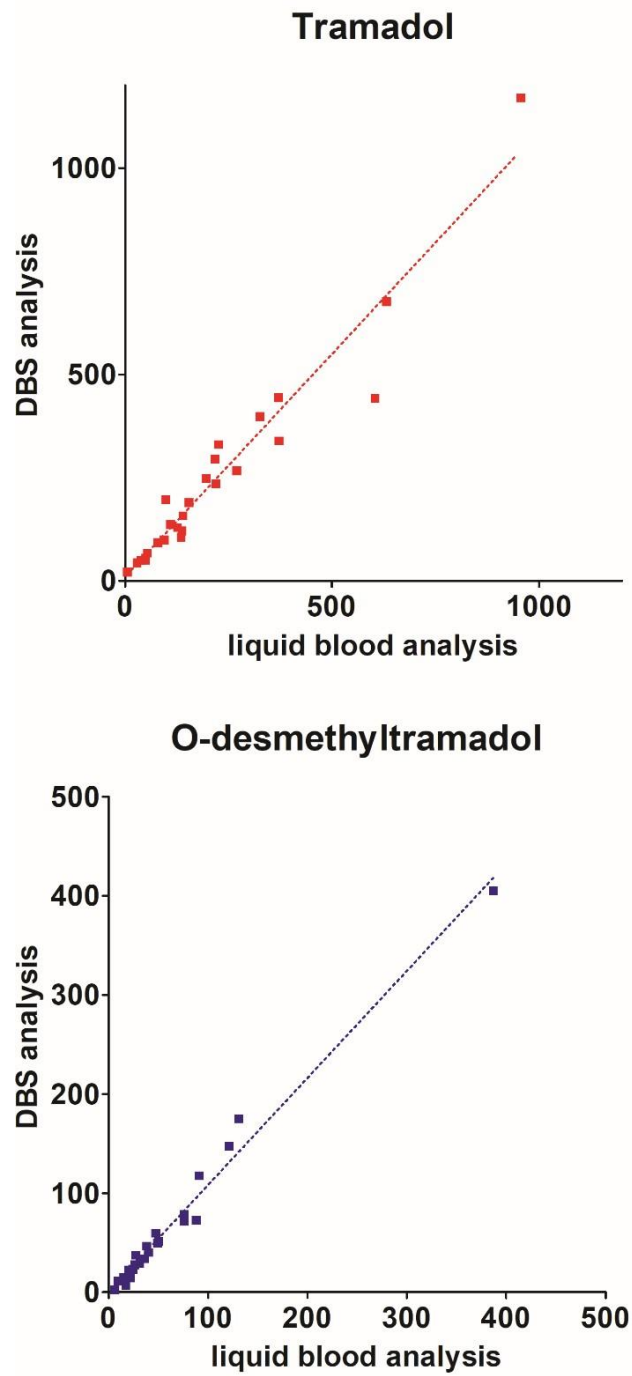


Рис 4 Перекрестное сравнение результатов автоматического DBS анализа и анализа жидкой крови.