

Análise completamente automatizada de dried spot para quantificação rápida de tramadol e seus metabólitos em várias matrizes

Autores: I-Lin Wu,¹ Jingshu Guo,¹ Yu Zhu,¹ Stephanie Samra,¹ Kerry Hassell,¹ Tanis Correa,¹ Joe Takarewski,² e Catherine Lafontaine²

¹Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, US

²Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, US

Palavras-chave: Sistema Transcend DSX-1, tecnologia TurboFlow, espectrômetro de massa TSQ Altis MD, software TraceFinder, software Aria MX, análise de dried spot, coletor de amostras automático, dried blood spot (DBS), matriz de dried spot, tramadol, SPE on-line, 2D-LC/MS, LC/MS, antidoping humano

Benefícios da Aplicação

- Fluxo de trabalho de análise de dried spot completamente automatizado com software integrado para controle simplificado de instrumentos
- Tecnologia flow-through desorption (FTD™) sem perfuração manual e extração de discos de dried spot
- Intelligent Vision Camera (IVC™) para reconhecimento preciso de mancha, posicionamento, ID do código de barras, rastreabilidade da amostra e cadeia de custódia

Objetivo

- Demonstrar o fluxo de trabalho integrado e benefícios do sistema Transcend™ DSX-1 da Thermo Scientific™, que combina um coletor automático de amostras de dried spot e um sistema UHPLC para automatizar completamente a amostragem e análise de dried spot.
- Destacar como a tecnologia inovadora flow-through



desorption (FTD™) do coletor automático de amostras permite a dessorção direta dos analitos dos cartões de dried spot até o sistema UHPLC, que incorpora a tecnologia avançada TurboFlow™ da Thermo Scientific™, para executar a limpeza de amostras on-line e separação da cromatografia líquida, que quando combinada com espectrometria de Massa (MS) permite uma quantificação rápida do tramadol e seus metabólitos de diversas matrizes de dried spot.

Introdução

Tramadol é um analgésico opioide sintético de ação central e amplamente prescrito para aliviar a dor aguda ou crônica. O tratamento da dor é alcançado por um mecanismo duplo. O tramadol inibe a recaptação de neurotransmissores, enquanto seu metabólito M1, O-desmetiltramadol, ativa o receptor

μ -opioides.¹ A biodisponibilidade do tramadol está em torno de 70% e aproximadamente 10 a 30% é excretado inalterado na urina. O mecanismo distinto e o menor risco de dependência comparado a outros opioides o torna uma escolha popular para prescritores. No entanto, uso indevido e visitas ao pronto-socorro estão aumentando. Muitos métodos bioanalíticos relataram a quantificação do tramadol ou de seus metabólitos em diversas matrizes biológicas (sangue, soro, urina, cabelo) usando cromatografia gasosa ou líquida (GC ou LC)-espectrometria de massa.²⁻⁴

No ambiente esportivo, o tramadol está no programa de monitoramento da Agência Mundial Antidoping (WADA) desde 2012 e chamou uma atenção significativa para sua prevalência em comunidades de ciclistas nos últimos anos. Em um relatório de monitoramento esportivo publicado em 2017, 68% das amostras de urina contendo tramadol foram de ciclistas.⁵ Enquanto ainda é debatido se o uso de tramadol leva a melhorias no desempenho, um atleta pode sentir fadiga e confusão pelo uso de tramadol, o que pode criar situações perigosas. Em 2019, a Union Cycliste International (UCI) banuiu o uso de tramadol no ciclismo profissional com penalidades variando de desclassificação a nove meses de suspensão. A UCI também forneceu sugestões de orientações para coletar gotículas de sangue de atletas em competição aleatoriamente durante toda a competição e enviá-las para análise laboratorial.⁶ Portanto, é necessária a implementação da coleta de amostra de dried blood spot (DBS), juntamente com análise de alto rendimento, para determinar a presença de tramadol e metabólitos (Figura 1) que são usados como indicadores para a presença ou ausência de ingestão de drogas.⁷⁻⁸

A análise de dried spot, particularmente DBS, se tornou uma tecnologia emergente em aplicações em pesquisas clínicas e toxicologia, como erros inatos do metabolismo, pesquisa de monitoramento de droga terapêutica, toxicologia forense e antidoping.⁹ Ela exige apenas a coleta de volumes pequenos de amostras com os benefícios de um procedimento de amostragem menos invasivo, menor risco de infecções e facilidade em transporte e logística. Enquanto a análise de dried spot

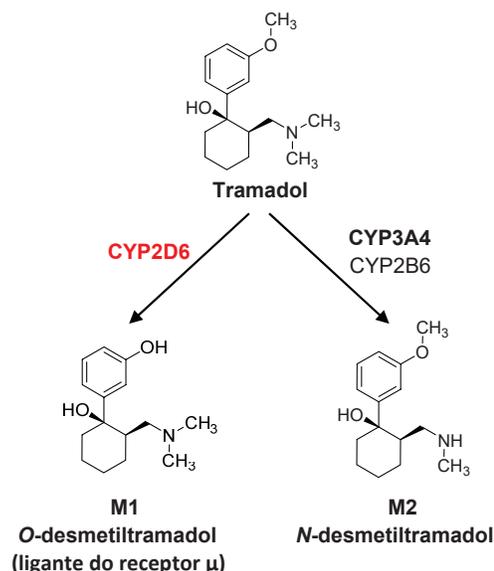


Figura 1. A via metabólica do tramadol e seus metabólitos principais.

ganhou popularidade ao longo dos anos, o fluxo de trabalho tradicional ainda utiliza a perfuração manual de disco seguida por procedimentos de preparo da amostra, incluindo várias extrações, evaporação e reconstituição para análises subsequentes.¹⁰ O processo inteiro pode levar várias horas.

Essa nota técnica demonstra um fluxo de trabalho completamente automatizado para análise de dried spot usando o sistema Transcend DSX-1. O sistema DSX-1 elimina a necessidade da perfuração manual de disco e extração, reduzindo erros humanos. A integração inovadora do preparo da amostra com a análise on-line utilizando um coletor automático de amostra de dried spot revolucionário capaz de flow-through desorption, seguida por uma análise bidimensional TurboFlow UHPLC-MS/MS é adequada para lidar com a limpeza de amostra de várias biomatrizes, separação e identificação (Figura 2). A quantificação rápida de tramadol e metabólitos em amostras secas de urina, sangue, soro e saliva foi alcançada com linearidade de 5 a 400 ng/mL que atendeu às necessidades diferentes de corte, dependendo dos regulamentos.

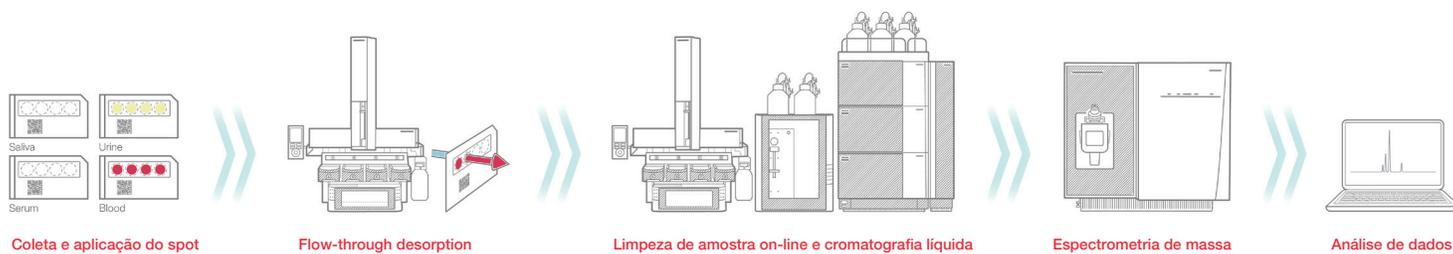


Figura 2. Análise automatizada de dried spot: Sistema Transcend DSX-1 combinado com o espectrômetro de massa série TSQ Altis MD

Experimental

Preparação da amostra

Tramadol e metabólitos (O-desmetiltramadol, N-desmetiltramadol) foram misturados em amostras de sangue, soro, urina e saliva em uma concentração variada de 5 a 400 ng/mL. Uma alíquota de 6 µL de amostra foi marcada em três das quatro posições em cada cartão DBS (Qiagen FTA™ DMPK-Tipo C, Ahlstrom AutoCollect™ ou Perkin Elmer 226 Bioanalysis RUO). A quarta posição foi reservada para a etapa de limpeza do coletor automático de amostras. Os cartões de amostra foram secos à temperatura ambiente e colocados diretamente no suporte de cartões do coletor automático de amostras.

Extração completamente automatizada de amostra

O módulo de dried spot (DSM) foi ligado à parte dianteira do sistema LC-MS e configurado com uma braçadeira de tamanho padrão para dessorver uma mancha de 6 mm do cartão. Padrões internos (IS, tramadol-¹³C-d₃, O-desmetiltramadol-d₆, N-desmetiltramadol-d₃) foram entregues pela bomba de carregamento IS incorporada no DSM para aplicar uma quantidade precisa em cada mancha. A eluição foi realizada usando água contendo ácido fórmico 0,1% em água (v/v) com uma taxa de fluxo de 1 mL/min por 30s com HotCap™ habilitado a 100 ° C seguido por 20s de secagem usando um compressor de ar interno para lavar a fase móvel residual. Manchas individuais foram fotografadas com o IVC™ antes e depois de cada análise para verificar a

presença de uma mancha, ajustar a posição para extração e verificar a ocorrência da extração. Após o processo de dessorção, o topo da braçadeira foi lavado com o ácido fórmico 0,1% em água (v/v) (lavagem 1) e acetonitrila/isopropanol/acetona (30/30/40) (v/v/v) (lavagem 2)

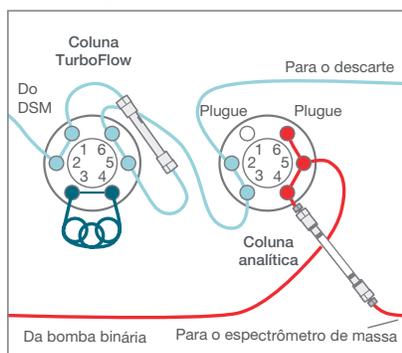
Limpeza de amostra on-line cromatografia líquida

Limpeza on-line e separação cromatográfica on-line foram realizadas em uma plataforma UHPLC habilitada com a tecnologia TurboFlow™, consistindo de uma coluna Cyclone™-P (0,5 x 50 mm) da Thermo Scientific™ seguida por uma coluna analítica bifenil (3 x 50 mm, 2,6 µm). O método TurboFlow foi configurado no modo Focus, no qual um loop extra foi preenchido com uma composição específica de solvente otimizada para uma eluição eficiente dos analitos da coluna TurboFlow antes de entrar na coluna analítica. O processo de análise e a via de fluxo são divididos em quatro etapas principais (Figura 3):

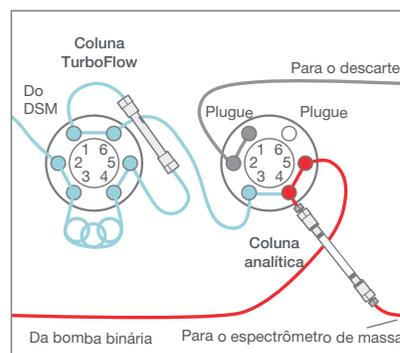
1. Carregamento da amostra na coluna TurboFlow
2. Eluição dos analitos da coluna TurboFlow e transferência para a coluna analítica
3. Separação dos analitos na coluna analítica e lavagem da coluna TurboFlow
4. Equilíbrio da coluna analítica, reabastecimento do loop de transferência e equilíbrio da coluna TurboFlow

As fases móveis e os gradientes detalhados usados nesta nota técnica estão descritos na Tabela 1.

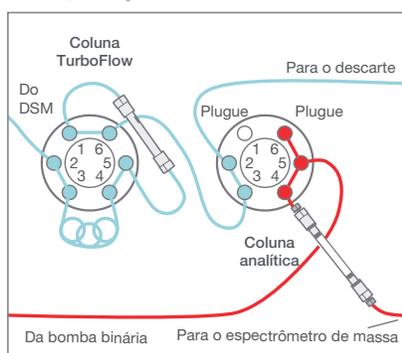
1. Carregar amostra



2. Transferir



3. Separação analítica



4. Equilíbrio

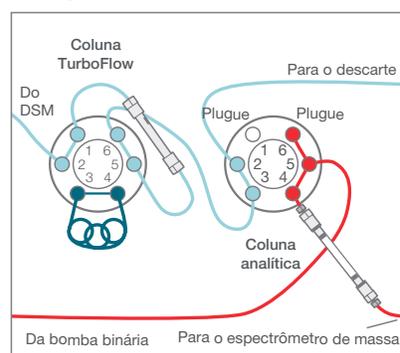


Figura 3. Tecnologia TurboFlow para limpeza de amostra (modo Focus)

Tabela 1. Condições da cromatografia líquida

Tempo (min)	Coluna TurboFlow						Coluna analítica		
	Taxa de fluxo*	% A	% B	% C	Tee	Loop	Taxa de fluxo*	% A	% B
0	1,0	100	—	—	=====	out	0,5	100	—
0,5	0,1	100	—	—	T	in	0,4	100	—
1,5	2	—	—	100	=====	in	0,5	85	15
2,5	2	100	—	—	=====	in	0,5	25	75
4,5	2	—	100	—	=====	in	0,5	—	100
5,5	2	—	100	—	=====	in	0,5	—	100
6,5	2	100	—	—	=====	out	0,5	95	5
7	2	100	—	—	=====	out	0,5	100	—
8	2	100	—	—	=====	out	0,5	100	—
Fase móvel	A: ácido fórmico 0,1% em água B: formiato de amônio 10 mM em metanol C: 40% de acetonitrila: 40% de isopropanol: 20% de acetona (v/v/v)						A: formiato de amônio 10 mM em água B: formiato de amônio 10 mM em metanol		

*Taxa de fluxo (mL/min)

Espectrometria de massa

A análise foi realizada usando um espectrômetro de massa série TSQ Altis™ MD da Thermo Scientific™ equipado com uma fonte de íons OptaMax™ NG da Thermo Scientific™ com uma sonda de ionização por electrospray aquecido (HESI), operando no modo de íon positivo (3,5 kV). Outras condições de fonte estão listadas na Tabela 2. Monitoramento de reação selecionada (SRM) em transições de compostos, energia de colisão otimizada e lentes RF são exibidos na Tabela 3.

Análise de dados

Os dados foram adquiridos e processados usando o software TraceFinder™ da Thermo scientific™.

Resultados e discussão

Amostras colocadas nos cartões de dried spot foram submetidas à análise sem tratamentos adicionais. O tempo total de execução, incluindo a extração, é de aproximadamente 8 minutos

Tabela 2. Configurações de fonte do espectrômetro de massa

Parâmetro	Configuração	Parâmetro	Configuração
Polaridade	Positiva	Tempo de ciclo (segundos)	0,4
Sheath gas (Arb)	50	Resolução Q1 (FWHM)	0,7
Aux gas (Arb)	10	Resolução Q3 (FWHM)	1,2
Sweep gas (Arb)	0	Fragmentação de fonte	0
Temperatura do tubo de transferência iônica (°C)	325	Largura do pico cromatográfico (segundos)	6
Temperatura do vaporizador (°C)	350	Gás da CID (mTorr)	1,5

e detecção. O Aria™ MX da Thermo Scientific™, um software integrado, é usado para controlar todos os parâmetros de instrumento para a dessorção da amostra e separação LC para facilitar o uso e o paralelismo entre instrumentos para maximizar a produtividade.

Tabela 3. Transições otimizadas de SRM, energias de colisão (CEs) e lentes RF para tramadol e metabólitos

Analito	Precursor (m/z)	Produto (m/z)	Energia de colisão (V)	Lentes RF (V)
Tramadol ¹	264,2	58,2	54	37
Tramadol ²	264,2	42,3	17	37
Tramadol- ¹³ C-d ₃	268,2	58,2	17	37
O-desmetiltramadol ¹	250,2	58,1	18	35
Odesmetiltramadol ²	250,2	42,1	55	35
Odesmetiltramadol-d ₆	256,2	64,1	18	35
N-desmetiltramadol ¹	250,2	44,0	14	35
N-desmetiltramadol ²	250,2	232,0	8	35
N-desmetiltramadol-d ₃	253,3	47,0	14	35

1: quantificador; 2: qualificador

Tabela 4. Dados de precisão e acurácia em diferentes matrizes de dried spot

Concentração (ng/mL)	Sangue total			Saliva			Soro			Urina			Padrão		
	% Diff	% RSD	% CV	% Diff	% RSD	% CV	% Diff	% RSD	% CV	% Diff	% RSD	% CV	% Diff	% RSD	% CV
Tramadol															
5	18,5	5,6	7,8	3,1	8,8	6,9	4,3	5,0	5,4	-9,1	4,7	3,5	11,2	6,3	8,0
10	-3,1	15,4	18,6	3,0	10,3	9,1	0,9	5,4	5,6	9,6	13,8	12,1	0,5	4,4	4,9
25	-3,0	5,2	5,6	-1,6	6,8	6,5	0,1	5,8	5,9	8,9	12,3	11,7	-7,5	5,4	5,7
50	-6,2	8,5	8,8	1,3	8,3	8,1	-3,2	7,7	7,7	8,7	9,1	8,8	-4,4	7,0	7,2
100	-4,2	6,5	6,6	-0,3	7,4	7,3	0,2	9,6	9,7	10,9	4,8	4,7	-1,4	8,5	8,6
200	-3,5	7,9	7,9	-1,4	8,1	8,0	-1,3	5,5	5,5	0,9	8,0	7,9	0,9	8,0	8,0
400	3,6	7,9	7,9	2,3	7,6	7,6	1,0	8,7	8,7	-4,8	5,8	5,8	0,8	7,1	7,1
O-Desmetiltramadol															
5	16,1	6,1	9,2	7,8	6,9	6,4	2,8	6,3	7,2	-5,0	4,3	3,6	6,6	6,1	7,3
10	-3,3	14,9	18,7	4,2	9,1	8,7	-0,5	4,9	5,2	3,8	13,6	12,5	-0,6	4,2	4,6
25	-1,6	4,9	5,3	-4,7	4,6	4,5	-0,1	4,7	4,8	4,6	11,1	10,7	-4,9	4,7	4,9
50	-5,5	8,1	8,5	-3,9	6,1	6,0	-1,5	7,6	7,7	5,5	5,4	5,3	-2,1	6,4	6,6
100	-4,0	6,0	6,1	-1,9	7,5	7,4	1,1	9,4	9,5	8,7	4,4	4,3	-0,4	5,9	6,0
200	-3,1	7,9	7,9	-0,9	9,0	9,0	-1,0	5,7	5,7	-0,9	7,9	7,8	1,6	5,3	5,3
400	3,3	7,4	7,5	3,1	7,9	7,9	0,4	8,0	8,0	-2,6	5,5	5,5	-0,2	6,0	6,0
N-Desmetiltramadol															
5	18,4	5,8	9,1	8,6	7,4	7,9	4,1	5,8	6,8	-4,5	6,0	5,4	12,6	5,9	9,0
10	-2,3	15,1	19,3	2,4	7,3	7,6	0,7	5,7	6,2	1,2	2,9	2,7	0,5	5,0	6,1
25	-3,3	6,0	6,6	-4,1	4,1	4,2	-0,3	5,4	5,6	-2,0	1,1	1,1	-8,3	6,9	7,5
50	-6,4	8,6	9,0	-1,1	7,0	7,0	-2,7	8,0	8,1	3,7	2,2	2,2	-5,5	8,8	9,2
100	-4,5	6,0	6,1	-2,4	7,2	7,2	0,7	9,9	10,0	8,9	0,5	0,5	-1,3	8,6	8,8
200	-3,5	8,5	8,6	-1,6	7,8	7,8	-1,7	5,9	5,9	1,5	5,1	5,0	1,2	7,6	7,7
400	3,7	8,0	8,0	3,9	8,2	8,2	1,0	9,2	9,2	-3,2	3,5	3,5	0,8	8,5	8,6

O fluxo de trabalho da quantificação é avaliado com o módulo de entrega IS incorporado. Portanto, a eficiência de extração e a recuperação do analito podem ser comparadas entre várias matrizes (dados não apresentados). Amostras misturadas de cinco matrizes (sangue, saliva, soro, urina, água) foram marcadas em réplicas de cartões de vários fornecedores para avaliar o desempenho do fluxo de trabalho automatizado e compatibilidades de cartões. Dados de acurácia e precisão que combinaram cartões de fornecedores diferentes estão listados na Tabela 4, com todos os analitos dentro dos limites de aceitação (% RSD e % CV abaixo de 20%). Para avaliar a reprodutibilidade da resposta MS, áreas de pico do IS (tramadol-13C-d3) foram analisadas a partir de mais de 70 injeções de várias matrizes, e a % RSD foram observadas abaixo de 15% (Figura 4)

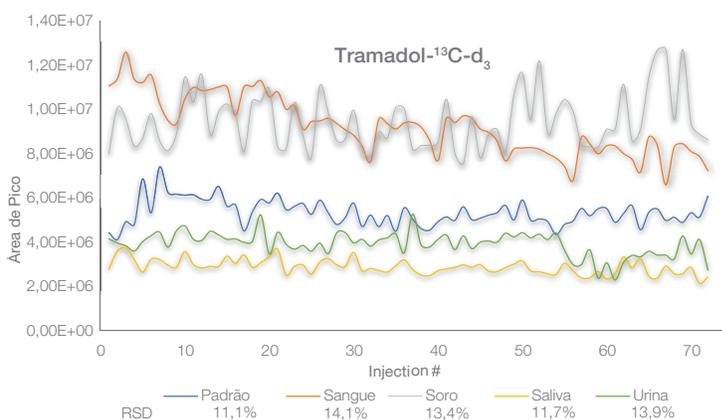


Figura 4. Resposta da área de pico do padrão interno de tramadol em 70 execuções

Curvas de calibração para analitos individuais foram geradas usando um fator de peso de 1/x de um baixo limite de quantificação (LLOQ) de 5 ng/mL até um alto limite de quantificação (ULOQ) de 400 ng/mL, com valores de $R^2 > 0,99$ e % RSD de padrões internos $< 20\%$ em todas as matrizes. Bases de dados de

manchas de sangue seco são exibidas na Figura 5 como um exemplo. Cromatogramas representativos de LLOQ e imagens pré e pós-análise também são mostrados na Figura 6. A capacidade de amostra é expandida com um cassete de 96 cartões, permitindo a análise de 288 amostras em alto rendimento.

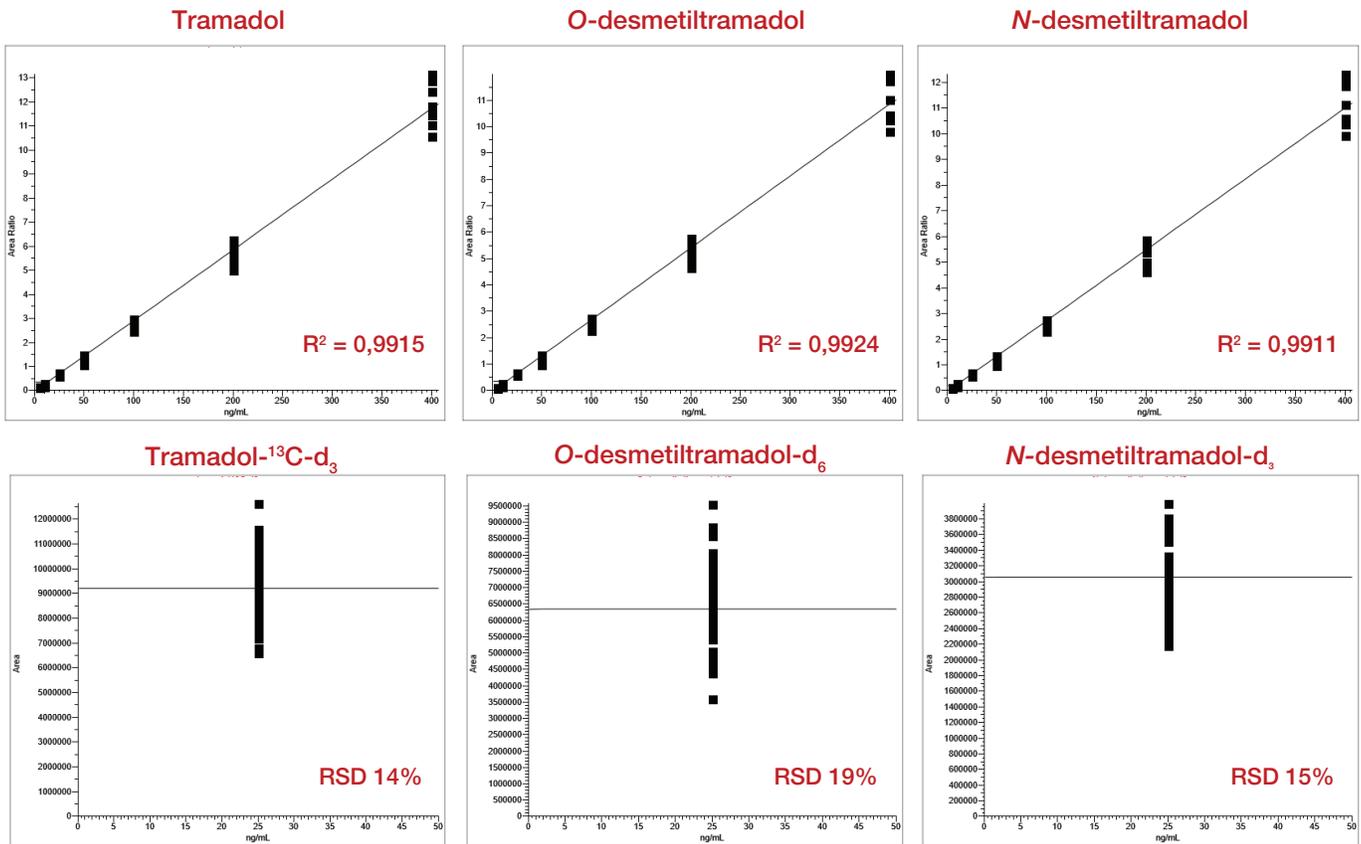


Figura 5. Curvas de calibração e padrões internos em base de dados de dried blood spot (DBS) (N = 9 cartões de fornecedores combinados)

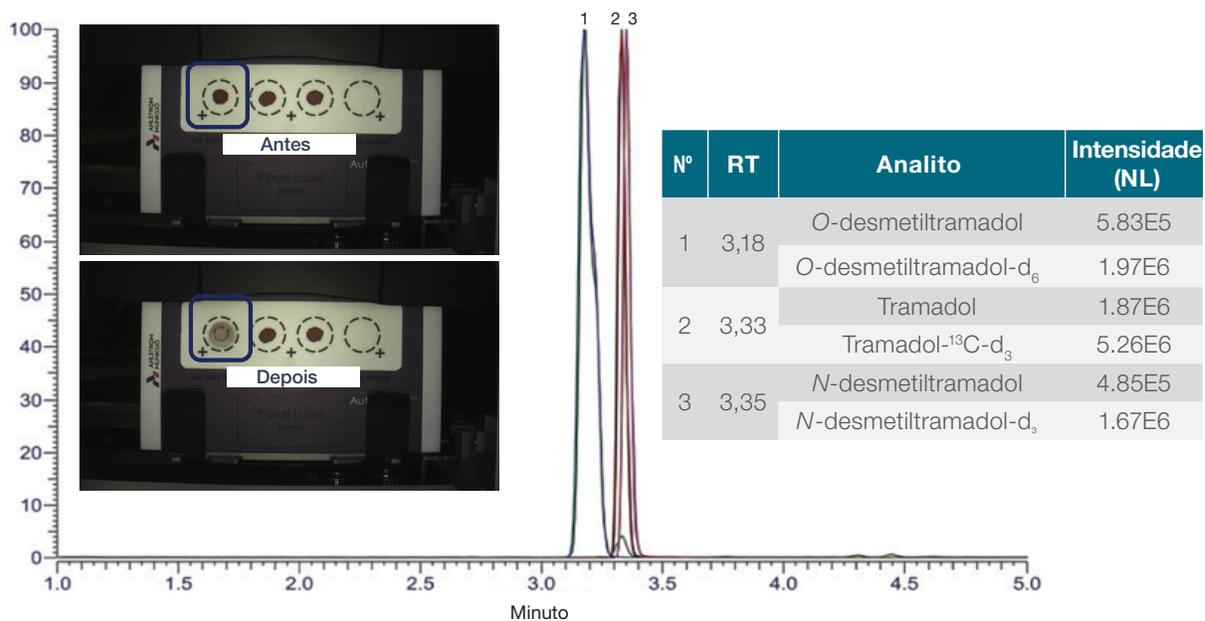


Figura 6. Cromatogramas de LLOQ em dried blood spot (DBS) e imagens pré e pós-análise

Conclusão

Tramadol e seus metabólitos foram analisados em várias matrizes biológicas, como urina, saliva, sangue ou soro para fins de monitoramento terapêutico, abuso de drogas e doping esportivo. Espécimes secos oferecem diversas vantagens incluindo a estabilidade do analito, facilidade de amostragem e conveniência logística ao se tratar de transferência e armazenamento. Métodos convencionais de análise de dried spot envolvem pré-tratamentos de amostra demorados, precisando de perfurações manuais que exigem trabalho, tempo e recursos adicionais. O sistema Transcend DSX-1 combina a tecnologia de amostragem direta inteligente de dried spot com a TurboFlow 2D-LC-MS/MS para oferecer um plataforma rápida, robusta e amplamente integrada, permitindo a extração de amostras, separação e análise de dados on-line, enquanto maximiza o rendimento e a economia da amostra e minimiza complexidade em processos de preparo da amostra tediosos.

A quantificação de tramadol e seus metabólitos foi avaliada em várias matrizes secas para reprodutibilidade e robustez entre conjuntos frandes de amostra, assim como compatibilidade usando diversos fornecedores de cartões. O método analítico descrito aqui oferece uma solução combinada e automatizada para alcançar uma execução analítica rápida para quantificação direcionada de amostras individuais de dried spot, autenticidade de amostra e segurança para manter a cadeia de custódia.

Referências

1. Miotto, K.; Cho, A.K.; Khalil, M.A.; Blanco, K.; Sasaki, J.D.; Rawson, R. Trends in tramadol: Pharmacology, metabolism, and misuse. *Anesth Analg.* **2017** Jan., 124(1), 44–51.
2. Hadidi, K.A.; Almasad, J.K.; Al-Nsour, T.; Abu-Ragheib, S. Determination of tramadol in hair using solid phase extraction and GC-MS. *Forensic Sci Int.* **2003** Ago. 12, 135(2), 129–36.
3. Patel, B.N.; Sharma, N.; Sanyal, M.; Shrivastav, P.S. An accurate, rapid and sensitive determination of tramadol and its active metabolite O-desmethyltramadol in human plasma by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* **2009** Fev. 20, 49(2), 354–66.
4. Haage, P.; Kronstrand, R.; Carlsson, B.; Kugelberg, F.C.; Josefsson, M. Quantitation of the enantiomers of tramadol and its three main metabolites in human whole blood using LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* **2016** Fev. 5, 119, 1–9.
5. Baltazar-Martins, G.; Plata, M.D.M.; Muñoz-Guerra, J.; Muñoz, G.; Carrera, S.D.; Del Coso, J. Prevalence of tramadol findings in urine samples obtained in competition. *Drug Test Anal.* **2019** Abr., 11(4), 631–634.
6. UCI Technical Rules on Tramadol. https://archive.uci.org/docs/default-source/clean-sport-documents/2019.04.05-uci-technical-rules-on-tramadol-final.pdf?sfvrsn=92b41507_2
7. Salamin, O.; Garcia, A.; González-Ruiz, V.; Rossi, F.; Bigard, X.; Déglon, J.; Daali, Y.; Faiss, R.; Saugy, M.; Rudaz, S. Is pain temporary and glory forever? Detection of tramadol using dried blood spot in cycling competitions. *Drug Test Anal.* **2020** Nov., 12(11–12), 1649–1657.
8. Luginbühl, M.; Angelova, S.; Gaugler, S.; Längin, A.; Weinmann, W. Automated high-throughput analysis of tramadol and O-desmethyltramadol in dried blood spots. *Drug Test Anal.* **2020** Ago., 12(8), 1126–1134.
9. Demirev, P. A. Dried blood spots: analysis and applications. *Anal Chem.* **2013** Jan. 15, 85(2), 779–89.
10. Weber, J.; Oberfeld, S.; Bonse, A.; Telger, K.; Lingg, R.; Hempel, G. Validation of a dried blood spot method for therapeutic drug monitoring of citalopram, mirtazapine and risperidone and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone using HPLC-MS. *J Pharm Biomed Anal.* **2017** Jun. 5, 140, 347–354.



Sistema Transcend DSX-1 configurado com o espectrômetro de massa TSQ Altis Plus

Saiba mais em thermofisher.com/TranscendDSX

Somente para uso geral em laboratório. Não deve ser usado em procedimentos de diagnóstico. © 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. O conceito Flow-through desorption (FTD), Intelligent Vision Camera (IVC), Automated Internal Standard Addition (AISA), High-Pressure Dispenser (HDP), e HotCap são marcas comerciais da Spark Holland. FTA é uma marca comercial registrada da Whatman Group. AutoCollect é uma marca comercial da Ahlstrom-Munksjö. Todas as outras marcas comerciais são propriedades da Thermo Fisher Scientific Inc. ou suas subsidiárias. Estas informações são apresentadas como um exemplo da capacidade dos produtos da Thermo Fisher Scientific Inc. Não se incentiva o uso desses produtos de qualquer maneira que possa violar os direitos de propriedade intelectual de outros. Especificações, termos e preços estão sujeitos a alterações. Nem todos os produtos estão disponíveis em todos os países. Entre em contato com seu representante de vendas local para mais detalhes **TN90660-PT-BR0322S**