

LC-MS/MS法测定浸润麻醉豚鼠血浆中罗哌卡因浓度

朱狄峰, 吴洪海, 吴国兰, 楼剑书, 何俏军, 杨波* (浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要:目的 建立测定豚鼠血浆中罗哌卡因浓度的液相三重四极杆串联质谱(LC-MS/MS)法,用以测定豚鼠局部浸润麻醉皮内注射后血浆中罗哌卡因浓度,并考察罗哌卡因药动学。方法 血浆样品用蛋白沉淀法进行预处理后HPLC-MS/MS法测定罗哌卡因含量。色谱系统:ZORBAX SB-C₁₈(3.0 mm×150 mm,3.5 μm),甲醇-水(80:20,内含5 mmol·L⁻¹甲酸铵)为流动相,流速0.4 mL·min⁻¹,柱温25℃。通过电喷雾离子源(ESI)三重四极杆串联质谱,在正离子模式下以多重反应选择离子检测(MRM)。色谱分析时间为4 min。药动学研究中豚鼠皮内浸润麻醉给药0.5%罗哌卡因注射液,按时测定血浆药物浓度。采用TOPFIT软件计算药动学参数。结果 罗哌卡因在6.58~6580 ng·mL⁻¹内线性良好($r=0.9991$),方法的最低检测浓度为1 ng·mL⁻¹,方法回收率在95.6%~96.6%之间,日内、日间精密度(RSD)均小于6%。豚鼠皮内注射0.5%罗哌卡因后,主要药动学参数: $T_{1/2\alpha}$ (0.13±0.01)h, $T_{1/2\beta}$ (1.20±0.08)h, $C_{\max}$ (4960±13)ng·mL⁻¹, AUC_{0-9} (11.3±1.6)mg·h·L⁻¹, $AUC_{0-\infty}$ (13.1±2.3)mg·h·L⁻¹,MRT(1.74±0.13)h。结论 建立的LC-MS/MS法快速、准确、灵敏,可用于罗哌卡因豚鼠浸润麻醉的药动学研究。

关键词:罗哌卡因;液相色谱-串联质谱;浸润麻醉;药动学

中图分类号:R969.11;R917.1;R971.2

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2008)03-0183-04

Determination of Ropivacaine in Guinea Pig Plasma after Infiltration Anaesthesia by Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry

ZHU Di-feng, WU Hong-hai, WU Guo-lan, LOU Jian-shu, HE Qiao-jun, YANG Bo* (College of Pharmaceutical Sciences,

作者简介:朱狄峰,男,硕士研究生,助理研究员
yaadang@zju.edu.cn

* 通讯作者:杨波,女,教授,博士生导师

Tel: (0571) 88208400

E-mail:

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a sensitive and selective LC - MS/MS method for the determination of ropivacaine and pharmacokinetics in guinea pig plasma. **METHODS** After a simple sample preparation procedure by one - step protein precipitation with acetonitrile, the HPLC separation of ropivacaine and the internal standard bupivacaine was performed on a Zorbax SB - C18 (3.0 150mm, 3.5 μ m) column. The mobile phase consisted of methanol - water (80:20, v/v, containing 5mM ammonium formate). Detection was performed on a triple quadrupole tandem mass spectrometer by multiple reaction monitoring (MRM) mode via electrospray ionization (ESI) source. The chromatogram was completed in 4 min at 25 $^{\circ}$ C. In positive mode, the m/z of ions selected for quantitation were 275.4/126.2 (ropivacaine) and 452.2/344.2 (internal standard, bupivacaine). In the study periods, a single 0.5% dose of ropivacaine was administered to each guinea pig. **RESULTS** The method had a lower limit of quantification of 1.0 ng mL $^{-1}$. The calibration curve was demonstrated to be linear over the concentration range of 6.58 - 6580 ng mL $^{-1}$. The relative recoveries were 95.6% - 96.6%, The inter and intra - day precision (RSD) were below 6%. The pharmacokinetic parameters of ropivacaine solution was as follows: $t_{1/2\alpha}$ (0.13 $\pm$ 0.01) h, $t_{1/2\beta}$ (1.20 $\pm$ 0.08) h, C_{max} (4960 $\pm$ 13) ng $\cdot$ mL $^{-1}$, AUC_{0-9} (11.3 $\pm$ 1.6) mg $\cdot$ h $\cdot$ L $^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$ (13.1 $\pm$ 2.3) mg $\cdot$ h $\cdot$ L $^{-1}$, MRT (1.74 $\pm$ 0.13) h. **CONCLUSION** The LC - MS/MS method is proved to be convenient, sensitive, rapid and suitable for pharmacokinetics study.

KEY WORDS: ropivacaine; LC-MS/MS; infiltration anaesthetic; pharmacokinetics

罗哌卡因 (ropivacaine) 是一种长效酰胺类局部麻醉药,能在不同剂量下产生不同的麻醉效果^[1]。临床上主要用于区域阻滞麻醉和硬膜外麻醉,也用于局部浸润麻醉。与布比卡因相比,罗哌卡因在心血管系统与中枢神经系统方面具有更大的安全范围^[2]。罗哌卡因在血中浓度过高时,对中枢神经系统会出现抑制和兴奋双重作用,对心血管系统有抑制心脏兴奋和延长传导。因此,为临床用药的安全,需要对罗哌卡因血浆药物浓度进行监测。

目前,国内外对罗哌卡因硬膜外腔阻滞麻醉及椎管麻醉^[3-5]报道较多,浸润麻醉方式下的药物浓度监测未见文献报道。罗哌卡因浸润麻醉给药血药浓度较低,HPLC的检测限为 25 ng $\cdot$ mL $^{-1}$ 不能满足需要。本研究目的在于了解罗哌卡因局部浸润麻醉后药动学变化,并建立了测定豚鼠血浆罗哌卡因浓度的液相串联质谱 (LC-MS/MS)高灵敏检测方法,用以测定豚鼠浸润麻醉后血浆中罗哌卡因浓度。本实验采用液相色谱串联质谱法,方法简便,专属性好,灵敏度高,内源性杂质不干扰,适于罗哌卡因浸润麻醉的药动学研究。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent RPLC 1200, 6410 Triple Quad LC - MS/MS三重四极杆质谱仪 (美国), Agilent MassHunter工作站 B.01.00. Eppendorf离心机 (Eppendorf Germany), Milli - Q超纯水器 (Millipore Inc. USA)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈 (色谱纯,德国 Merck公司),甲酸铵 (安捷伦科技公司,批号 40083), MilliQ 水,其他试剂为分析纯。0.5%罗哌卡因注射液 (Latitude Pharmaceuticals Inc, USA,批号:62-2-55)。罗哌卡因对照品 (中国药品生物制品检定所,含量 99.5%,批号:100548-200401),布比卡因 (浙江省药品检验所,含量 99.5%)。

1.3 动物

91只豚鼠 (雄性,400~600g)分为13笼,购自浙江大学动物实验中心。动物由专业人员检查后饲养7d适应环境。合格证号:SYXK(浙)2004-0052。

1.4 色谱条件

1.4.1 质谱条件 采用大气压电喷雾离子源 (ESI),多重反应选择离子监测 (MRM),正离子模式;离子源雾化气温度:330 $^{\circ}$ C;雾化气压力:206.8 kPa;反吹气流量 9 L $\cdot$ min $^{-1}$;毛细管电压 3500 V;罗哌卡因及内标布比卡因碎片电压均为 20 V。罗哌卡因及内标布比卡因的母离子及子离子 m/z 分别为 275.4/126.2, 289.4/140.3。

1.4.2 液相条件 色谱柱:ZORBAX SB - C₁₈ (3.0 $\times$ 150 mm, 3.5 μ m);流动相:甲醇 - 水 (80:20,内含 5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 甲酸铵);流速:0.4 mL $\cdot$ min $^{-1}$;柱温:25 $^{\circ}$ C。

1.5 药动学研究

1.5.1 血样采集 豚鼠室内适应环境7d后,氟烷麻醉,皮内注射0.5%罗哌卡因注射液1mL,按时心脏采血。罗哌卡因溶液组共13个取样时间点,每个时间点7只。血浆收集时间点为0,0.25,0.33,0.5,0.75,1,1.5,2,3,4,5,6和9h。离心后取50 μ L血浆备用。

1.5.2 血浆样品处理 取豚鼠血浆50 μ L加入10 μ L内标 (布比卡因,240 ng $\cdot$ mL $^{-1}$),混匀后加入1mL乙腈沉淀蛋白,离心后上清液过0.45 μ m的滤膜,2 μ L HPLC进样。

1.5.3 药动学参数及数据计算 实验获得的血药浓度数据经 TopFit药动学软件拟合曲线,得到罗哌卡因药动学参数。主要药动学参数包括: AUC_{0-T} , $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , MRT, $t_{1/2}$ 及CL等。试验数据包括血样采集各个时间点药物浓度测定数据,所得数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 方法学考查

2.1.1 标准储备液的配制 ①罗哌卡因标准液的配制:精密称取罗哌卡因对照品6.58mg,用甲醇溶解定容至10mL,

配制成相当于 0.658 mg· mL⁻¹罗哌卡因贮备液,临用时用甲醇稀释到相应的浓度。②布比卡因内标准储备液的配制:精密称取布比卡因 24.00 mg,用甲醇溶解后,稀释至 240 ng· mL⁻¹备用。

2.1.2 方法专属性 罗哌卡因和布比卡因结构见图 1。在本试验条件下,空白血浆中内源性物质对测定无干扰。罗哌卡因和布比卡因有较大的质谱峰和较好的分离度。豚鼠血浆中杂质不干扰样品峰,基线噪音小,罗哌卡因和布比卡因(内标)保留时间分别为 2.99 和 3.43 min,整个色谱分析时间为 4 min。罗哌卡因和布比卡因质谱图见图 2。结果表明在此条件下所测得的结果能代表罗哌卡因浓度。

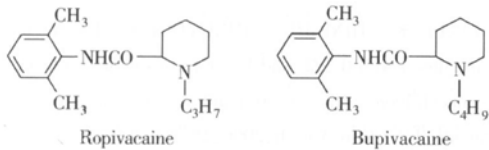


图 1 罗哌卡因及布比卡因结构式
Fig 1 Structural formula of ropivacaine and the internal standard bupivacaine

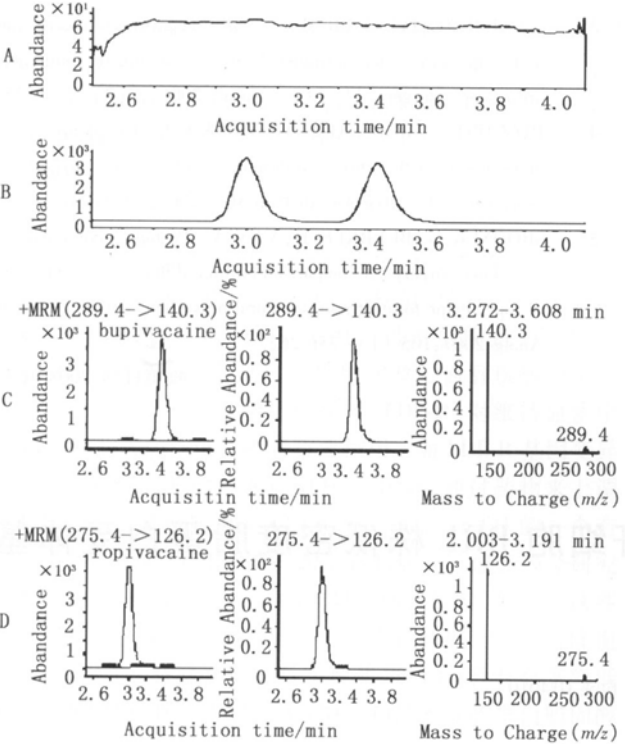


图 2 血浆样品色谱图
A - 空白血浆 MRM 色谱图;B - 罗哌卡因对照品(a)与布比卡因(b)混合溶液 MRM 色谱图;C - 罗哌卡因离子色谱图;D - 布比卡因离子色谱图
Fig 2 Chromatograms of guinea pig plasma
A - blank plasma; B - blank plasma spiked with ropivacaine and the internal standard bupivacaine; C - Chromatograms of ropivacaine, m/z 275.4/126.2; D - Chromatograms of bupivacaine, m/z 289.4/140.3

2.1.3 标准曲线和线性范围 在空白血浆中加入适量罗哌卡因标准液配得浓度为 1.00, 6.58, 32.9, 65.8, 164.5, 329,

658, 1 645, 3 290, 6 580 ng· mL⁻¹的系列血浆样品。按相应的“血浆样品处理”项处理后进行分析,建立标准曲线。以血浆样品中待测物浓度为横坐标(x),待测物面积为纵坐标(y),进行线性回归,得标准曲线回归方程为 $y = 90.624x + 1971.3$ ($r = 0.9991$),本法的线性范围为 6.58 ~ 6 580 ng· mL⁻¹,最低检测浓度为 1 ng· mL⁻¹。

2.1.4 准确度实验测定其方法回收率 在空白血浆中加入适量罗哌卡因标准液配得低、中、高 3 个浓度(分别为 6.58, 1 645, 6 580 ng· mL⁻¹)的质控样品,按“血浆样品处理”项处理后进样,每一浓度进行 6 样本分析,从而求得血浆中罗哌卡因回收率。回收率 = 测得浓度 / 加入浓度 × 100%,每种浓度重复 6 次,结果见表 1。

表 1 罗哌卡因在豚鼠血浆中的回收率 (n=6)

Tab 1 Recovery of ropivacaine in guinea pig plasma (n=6)

加入量 / ng· mL ⁻¹	回收率 / %	RSD / %
6.58	96.6 ± 5.5	5.69
1 645	95.6 ± 3.8	3.92
6 580	96.2 ± 7.6	7.86

2.1.5 精密度实验 在空白血浆加入适量罗哌卡因标准液配得低、中、高 3 个浓度(分别为 6.58, 1 645, 6 580 ng· mL⁻¹)的质控样品,按“血浆样品处理”项处理后进样,每一浓度进行 6 样本分析,连续 3 d,考察日内和日间精密度,结果见表 2。

表 2 日内和日间精密度 (n=6)

Tab 2 Precision of ropivacaine (n=6)

加入量 / ng· mL ⁻¹	日内精密度 RSD / %	日间精密度 RSD / %
6.58	5.27	3.78
1 645	5.06	4.18
6 580	2.35	2.17

2.1.6 稳定性考察 ①上样液稳定性:按“血浆样品处理”项制备低、中、高(6.58, 1 645, 6 580 ng· mL⁻¹)三种浓度的样品,置室温中分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 内测定,结果其 RSD 均小于 5.52%,表明样品测定溶液在 24 h 内基本稳定。②冻融稳定性:按“血浆样品处理”项制备低、中、高(6.58, 1 645, 6 580 ng· mL⁻¹)三种浓度的样品,放入冰箱冷冻(-20℃)保存,然后取出化冻后测定,反复冻融 3 次。测得其 RSD 最大值为 6.08%,表明罗哌卡因血浆样品反复冻融 3 次后基本稳定。结果见表 3。

表 3 罗哌卡因在血浆中冻融稳定性试验结果 (% , n=6)

Tab 3 Stabilities of ropivacaine in guinea pig plasma (% , n=6)

加入量 / ng· mL ⁻¹	上样液稳定性 RSD / %	冻融稳定性 RSD / %
6.58	3.39	4.52
1 645	5.52	6.08
6 580	2.02	4.15

2.2 血药浓度及药动学参数

豚鼠给予罗哌卡因后平均药-时曲线见图 3,按“药动学参数及数据计算”项经过 Topfit软件计算后主要药动学参数见表 4。

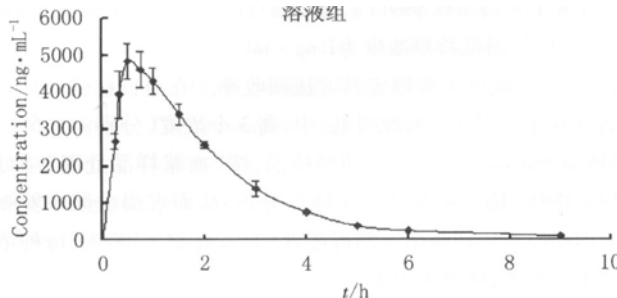


图 3 豚鼠皮内注射 0.5%罗哌卡因平均血药浓度-时间曲线 (n=7)

Fig 3 Mean plasma concentration - time curves after administration of a single dose of ropivacaine (n=7)

表 4 豚鼠皮内注射 0.5%罗哌卡因注射液后药动学参数

Tab 4 Pharmacokinetic parameters for guinea pigs after administration of a single dose of ropivacaine

药动学参数	罗哌卡因
$t_{1/2\alpha}/h$	0.13 ±0.01
$t_{1/2\beta}/h$	1.2 ±0.08
V/L	15.4 ±0.17
CL/mL·min ⁻¹	148.0 ±2.01
C _{max} /ng·mL ⁻¹	4960.0 ±13.25
AUC ₀₋₉ /mg·h·L ⁻¹	11.3 ±1.57
AUC _{0-∞} /mg·h·L ⁻¹	13.1 ±2.30
MRT/h	1.74 ±0.13

3 讨论

由于罗哌卡因浸润麻醉豚鼠血浆中罗哌卡因浓度较低,且存在较大的个体差异,本实验在分析仪器选择过程中,比

较了液相色谱与 LC-MS/MS法测定豚鼠血浆中罗哌卡因浓度,发现液相色谱法最低检测浓度仅为 25 ng·mL⁻¹,不能符合实验需要,故最终选择 LC-MS/MS法测定。色谱分析时间仅为 4 min。罗哌卡因的母离子及子离子 m/z 为 275.4/126.2;内标布比卡因的母离子及子离子 m/z 为 289.4/140.3。罗哌卡因在 6.58 - 6580 ng·mL⁻¹内线性良好,方法的最低检测浓度为 1 ng·mL⁻¹。本实验建立的 LC-MS/MS测定法,预处理法采用蛋白沉淀法,操作简便,可用于罗哌卡因浸润麻醉临床血药浓度的监测,亦为罗哌卡因的药动力学研究提供参考方法。

REFERENCES

[1] KAZUE K, SHINICHI S, HIROYUKI K. Effects of epidural anesthesia with 0.2% and 1% ropivacaine on predicted propofol concentrations and bispectral index values at three clinical end points[J]. J Clin Anesth, 2006, 18(6) : 409-414.

[2] SAWA Y, MATSUDA H, SHIMAZAKI Y. Evaluation of Leukocyte-depleted femoral blood cardioplegic solution in patients undergoing elective and emergency coronary artery bypass grafting[J]. J Cardiovasc Surg, 1994, 108: 1125-1131.

[3] NEVAL B, ZEKIYE B, BILGE K, et al. Comparison of ropivacaine and bupivacaine for intrathecal anesthesia during outpatient arthroscopic surgery[J]. J Clin Anesth, 2006, 18(7) : 521-525.

[4] RIZZOTTI L, ROUSSAKIS G, TRINKA C. Unilateral spinal anaesthesia with three different solutions of hyperbaric ropivacaine[J]. Reg Anesth Pain Med, 2005, 30(5) : 16.

[5] BRODNER G, BUERKLE H, VAN A. Postoperative analgesia after knee surgery: A comparison of three different concentrations of ropivacaine for continuous femoral nerve blockade[J]. Anesth Analg, 2007, 105(1) : 256-262.