

反相高效液相色谱法测定人血浆中甲哌卡因的浓度

隋因 唐云彪 颜鸣 高军 (沈阳军区总医院药剂科 沈阳 110016) 王海良 (本溪市中心医院药学部)

摘要 目的:建立反相高效液相色谱紫外法测定人血浆中甲哌卡因浓度。方法:采用 Diamonsil ODS C₁₈分析柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),柱温为室温,流动相为甲醇-乙腈-0.03 mol·L⁻¹ KH₂PO₄缓冲液(H₃PO₄调pH为5.3)(50:50:250),流速:1.0 ml·min⁻¹;0.5 ml血浆样品经固相萃取方法处理后,洗脱液在50℃条件下空气吹干,残渣用流动相溶解进样,紫外检测器检测,检测波长为210 nm。结果:标准曲线在20~4 000 ng·ml⁻¹范围内线性良好,最低定量限为20 ng·ml⁻¹,甲哌卡因及内标的保留时间分别为7.5 min和19.4 min,日内和日间RSD均<14.0%,方法提取回收率分别在103.5%~109.2%。结论:本法具有简便、灵敏、准确等优点,成功用于经硬膜外给予200 mg盐酸甲哌卡因患者血浆中甲哌卡因浓度测定及药动学研究。
关键词 甲哌卡因;血浆药浓度;反相高效液相色谱法

中图分类号:R965.1 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2011)03-0379-0

Determination of Mepivacaine in Human Plasma by RP-HPLC

Sui Yin¹, Tang Yunbiao¹, Yan Ming¹, Gao Jun¹, Wang Hailiang² (1 Department of Pharmacy, The General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China; 2 Department of pharmacy, Central hospital of Benxi)

ABSTRACT Objective: To establish a RP-HPLC method with ultraviolet detection for the determination of mepivacaine in human plasma. **Method:** Diamonsil ODS C₁₈ analysis column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. An aliquot of 0.5 ml human plasma was treated by solid-phase extraction (SPE). After evaporation of the organic layer, the residue was dissolved in 100 μl mobile phase and 50 μl was injected into the column. The mobile phase, consisted of methanol-acetonitrile-0.03 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate (pH was adjusted to 5.3 by NaOH) (10:10:50), was delivered at rate of 1.0 ml·min⁻¹. The detector was set at 210 nm. **Result:** The retention time of mepivacaine and internal standard (ropivacaine) was 7.4 min and 15.8 min, respectively. The standard curve was linear over the concentration range of 20 to 4 000 ng·ml⁻¹. The lower limit of quantification was 20 ng·ml⁻¹. The method extraction recoveries were between 103.5% to 109.2%. The intra- and inter-day precisions were both less than 14.0%. **Conclusion:** This method is simple, sensitive, accurate and successfully applied in the pharmacokinetic study of mepivacaine after epidural administration of 200 mg hydrochloride mepivacaine in a patient who needs surgical operation.

KEY WORDS Mepivacaine; Plasma drug concentration; RP-HPLC

甲哌卡因(mepivacaine)化学名为N-甲基-哌啶-2-甲酰-(2,6-二甲基)-苯胺盐酸盐,是酰胺类局部麻醉药,通过抑制神经细胞膜离子流而稳定神经细胞膜,阻止冲动的产生与传导。局麻药经全身性吸收后,可产生中枢神经系统兴奋、抑制或二者都有。明显的中枢神经系统兴奋表现为不安、震颤、寒战、渐进为惊厥,而后转入抑制,昏迷,最终进展为呼吸停止^[1-3]。有关甲哌卡因血浆浓度测定方法国内尚未见报道,仅见少量国外HPLC法和HPLC/MS法的报道^[4,5]。本文建立了RP-HPLC紫外检测法测定人血浆中甲哌卡因浓度,用于甲哌卡因在人体的药动学研究,同时为临床个体化给药和血药浓度监测提供了一种简便的分析方法。

1 材料

1.1 仪器

Waters 600系列高效液相色谱仪(美国Waters公司),包括2487紫外检测器,717自动进样器,Empower色谱工作站;离心机(TDL-5型,上海安亭医疗器械厂)、振荡混合器(YKH-II型,江西医疗器械厂)、氮吹仪等(WM-2H型无油气体压缩机,天津市医疗器械二厂)。

1.2 试剂与试剂

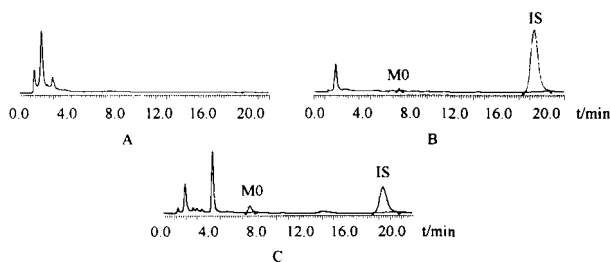
盐酸甲哌卡因对照品(纯度99.9%,批号060912,山东鲁抗辰欣药业有限公司)。内标盐酸罗哌卡因(纯度99.8%,批号060417,山东鲁抗辰欣药业有限公司)。甲醇、乙腈(色谱纯,Fisher公司)。其余试剂均为分析纯,水为重

蒸馏水。Pro Elute C₁₈固相萃取柱(美国迪马公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil ODS C₁₈分析柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm,迪马公司),流动相为甲醇-乙腈-0.03 mol·L⁻¹ KH₂PO₄缓冲液(H₃PO₄调pH为5.3)(10:10:50),流速:1.0 ml·min⁻¹;进样量为50 μl,紫外检测器波长为210 nm,柱温为室温。色谱图见图1,甲哌卡因的保留时间约为7.5 min,内标罗哌卡因的保留时间约为19.4 min。可见,血浆中内源性杂质不干扰被测物与内标的测定。



A. 空白血浆 B. 20.0 ng·ml⁻¹标准血浆样品
C. 受试者给药10h后的血浆样品 MO:甲哌卡因
IS:内标罗哌卡因(5 g·ml⁻¹)

图1 HPLC法测定血浆中甲哌卡因和内标罗哌卡因的典型色谱图

通讯作者:隋因 Tel:(024)28851750 E-mail:suiyinpharm@yahoo.com.cn

2.2 血浆样品的预处理

精密量取血浆 0.5 ml 置 10 ml 具塞玻璃试管中,加入内标工作液 50 μl ,加入 50 μl 甲醇水溶液 (50:50),旋涡 0.5 min,加入已活化好的固相萃取柱中,缓慢过柱后,分别以 1.0 ml 水洗涤 2 次,再以 1.0 ml 甲醇洗脱,并收集洗脱液,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中空气吹干,残渣用 100 μl 流动相溶解,进样 50 μl 。

2.3 方法专属性考察

空白血浆液、空白血浆加甲哌卡因和罗哌卡因对照品以及甲哌卡因注射液经局麻给药后的患者血浆样品,按“2.2”项下操作,进样分析,记录色谱图,考察在选定液相色谱条件下,血浆中内源性杂质对被测物及内标是否有干扰。

2.4 溶液配制

2.4.1 甲哌卡因对照品溶液配制 精密称取盐酸甲哌卡因对照品 50.0 mg,置于 50 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液适量,分别稀释定容至 10 ml 量瓶,配成浓度为 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 15 和 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的系列溶液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用(同时稀释 36 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 浓度的标准溶液用于高浓度的质控浓度,中低两浓度分别用 0.2 和 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)。

2.4.2 罗哌卡因溶液配制 精密称取罗哌卡因对照品 10.0 mg,置于 100 ml 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的内标贮备液。用时将其稀释成 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 浓度后使用,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用。

2.5 标准曲线制备

分别精密吸取甲哌卡因对照品溶液 50 μl ,加入空白血浆液 0.5 ml,配成甲哌卡因血浆液浓度分别为 20, 50, 100, 200, 500, 1 500 和 4 000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的血浆样品,按“2.2”项下操作并进样 50 μl 。记录色谱峰面积,由甲哌卡因与内标的峰面积比(Y)对浓度(X)回归,用加权法处理(权重 $1/C^2$),得回归方程为: $Y = 0.0013X + 0.0093$, $r = 0.9973$,甲哌卡因浓度在 20 ~ 4 000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 内线性关系良好,最低定量浓度为 20 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

2.6 日内、日间精密度

取空白血浆液配制的含甲哌卡因为 20, 200 和 3 600 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的样品,按“2.2”项下操作并进样,每一个浓度进行 6 样本分析,连续测定 3 d 并与标准曲线同时进行,以对照品和内标的峰面积比用当日的回归方程求出浓度,计算精密度。结果见表 1。

表 1 精密度试验结果 ($n=18$)

加入浓度 ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	测得浓度 ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	精密度 (%)	
		日间 RSD	日内 RSD
20	21.1 \pm 1.7	8.3	2.7
200	197 \pm 15	7.3	10.9
3600	3442 \pm 273	6.7	14.0

2.7 回收率试验

取空白血浆液配制的含甲哌卡因为 20, 200 和 3 600 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的系列标准血浆样本各 6 份,按“2.2”项下操作并进样,记录色谱图,甲哌卡因峰面积为 A_1 ;另取一定量的甲哌卡因对照品贮备液,配制成 20, 200 和 3 600 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的系列标准溶液浓度各 6 份以同体积进样,记录色谱图,甲哌卡因峰面积为 A_2 ,以 $(A_1/A_2) \times 100\%$ 计算提取回收率。另取空白血浆液配制的含甲哌卡因为 20, 200 和 3 600 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的系列标准血浆样本各 6 份,按“2.2”项下操作并进样,以实测值与理论值之比计算方法学回收率。结果见表 2。

表 2 提取回收率和方法回收率试验结果 ($n=6$)

加入浓度 ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	方法回收率 (%)	RSD (%)	提取回收率 (%)	RSD (%)
20	103.5 \pm 10.5	10.1	86.9 \pm 6.9	7.9
200	108.3 \pm 3.6	3.3	82.8 \pm 9.0	10.9
3600	109.2 \pm 7.1	6.5	86.7 \pm 6.6	7.7

2.8 稳定性试验

用空白人血浆配制 20, 200 和 3 600 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的质控样品,每个浓度各 4 份,分别测定室温放置 4 h、重溶后样品于自动进样器中放置 8 h、冻融 3 次及 -30 $^{\circ}\text{C}$ 放置 7 d 和 30 d 后的浓度,结果均符合要求。

2.9 硬膜外麻醉患者体内药动学研究

选取住院需要进行下肢手术的患者 1 名,心、肝、肾等主要脏器器官功能正常,术前、术中及术后 10 h 内合并用药不影响试验药物的分析测试。开始手术前,经肘静脉埋置留针后,于硬膜外麻醉给予 20% 盐酸甲哌卡因注射液 10 ml,分别于给药前、给药后 0.08, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 和 10 h 取静脉血 2.0 ml,至肝素化试管中后,离心分离出血浆, -30 $^{\circ}\text{C}$ 冰柜中保存待测。结果血药浓度-时间曲线见图 2。应用 DAS2.0 处理软件处理药动学参数,统计矩结果见表 3。

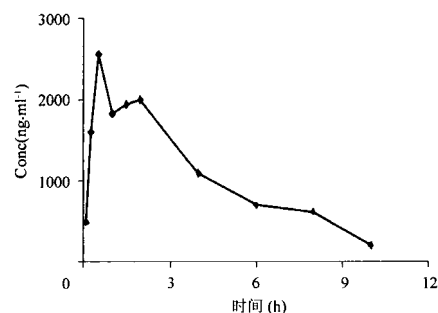


图 2 硬膜外给予盐酸甲哌卡因注射液 200 mg 后患者血浆中血药浓度-时间曲线

表 3 硬膜外给予 200 mg 盐酸甲哌卡因注射液后的药动学参数

参数	结果	参数	结果
C_{max} ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	2.56	$AUC_{(0-\infty)}$ ($\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$)	11.5
t_{max} (h)	0.5	$MRT_{(0-t)}$ (h)	3.43
$t_{1/2z}$ (h)	2.42	$CL_{z/F}$ ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)	17.4
$AUC_{(0-t)}$ ($\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$)	10.7	$V_{z/F}$ (L)	61.4

3 讨论

本法采用甲醇-乙腈-30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 缓冲液

HPLC测定安神健脑液中棘苷的含量

邓雪华 吴红菱 朱海涛 (湖北医药学院附属太和医院药剂部 湖北十堰 442000)

摘要 目的: 采用 HPLC 法测定安神健脑液中棘苷的含量。方法: 采用 Hypersil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.005 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 (12:88) 作为流动相, 流速为 0.8 ml·min⁻¹, 柱温: 30 ℃, 检测波长: 334 nm。结果: 棘苷在 4.2 ~ 84.0 μg·ml⁻¹ 范围内有良好的线性关系, 平均加样回收率为 98.8%, RSD = 0.83%。结论: 本方法快速简便, 重复性好, 结果准确, 可用于该制剂中棘苷的定量分析。

关键词 安神健脑液; 棘苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2011)03-0381-03

Determination of Spinosin in Anshen Jiannao Liquid by HPLC

Deng Xuehua, Wu Hongling, Zhu Haitao (Department of Pharmacy, Affiliated Taihe Hospital, Yunyang Medical University, Hubei Shiyan 442000, China)

ABSTRACT Objective: To establish an HPLC method for the determination of spinosin in Anshen Jiannao liquid. **Method:** The Hypersil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used, the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.005 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate (12:88), the flow rate was 0.8 ml·min⁻¹, the column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was 334nm. **Result:** The calibration curve was linear within the range of 4.2-84.0 μg·ml⁻¹, the average recovery was 98.8% with RSD of 0.83%. **Conclusion:** The method is simple, repeatable and accurate. It can be applied in quantitative determination of spinosin in Anshen Jiannao liquid.

KEY WORDS Anshen jiannao liquid; Spinosin; HPLC

安神健脑液是以我院中医科临床应用多年的汤剂为基础, 开发研制的一种纯中药复方制剂, 由酸枣仁、人参、五味子、丹参、等多味中药组成, 具有益气养血, 滋阴生津, 养心安神之功效, 用于气血两亏、阴津不足所致的失眠多梦, 神疲健忘, 头晕头痛, 心悸乏力, 口干津少等症。酸枣仁为方中君药, 具有养心补肝, 宁心安神, 敛汗, 生津之功效^[1], 含棘苷、皂苷等多种活性成分^[2]。棘苷 (spinosin) 又名斯皮诺

素, 为酸枣仁镇静安神的有效成分之一, 能显著增强戊巴比妥诱导睡眠的作用^[3,4], 延长睡眠时间, 短暂抑制神经中枢^[5]。本文采用 HPLC 法对安神健脑液中棘苷含量进行测定, 为全面评价该制剂质量和完善本复方制剂的质量标准提供试验依据。

1 仪器与试剂

Dionex-U3000 液相色谱仪 (戴安公司, Dionex Chemeleon

通讯作者: 邓雪华 Tel: 13886806691 E-mail: dxh91@163.com

(pH5.3) (10:10:50) 为流动相, 实验证明, 采用此流动相得到的峰形较好, 甲哌卡因、内标物与血浆中内源性物质分离效果好且保留时间合适。

样品处理方法曾考察过液-液萃取法和沉淀蛋白法, 但按文献^[5]的方法, 采用甲基-叔丁基醚为提取溶剂处理血浆样品时, 血浆中内源性杂质提取出来的较多, 柱子很容易降低分离效率, 且提取率较低, 无法满足测试要求。故采用固相萃取法处理样品, 提取回收率很高, 能够满足测试要求, 且杂质较少, 不干扰生物样品的测定。

实验过程中也曾经先后尝试用莫达非尼、曲马多、卡马西平、非那西丁和苦参碱为内标物, 但是在此色谱条件下盐酸甲哌卡因与内标物分离效果不好或内标提取率较低, 最终本实验采用的是罗哌卡因作为内标物。

本研究建立的 HPLC-UV 分析方法, 具有用血量适中 (0.5 ml)、灵敏度高、血浆样品前处理简便 (SPE 萃取) 等特点, 尤其适合临床合并用药较多的患者应用盐酸甲哌卡因注

射液后的药动学研究及血药浓度监测。

参 考 文 献

- 1 史宗道, 王晓毅, 成子怡, 等. 甲哌卡因 2% (特制) 局麻效果及安全性评价的多中心随机双盲临床试验 [J]. 中国循证医学, 2002, 2(2): 86-91
- 2 戴崇媛. 卡波卡因用于硬膜外麻醉临床观察 [J]. 兰州医学院学报, 1995, 21(4): 256
- 3 Covino BG. Pharmacology of local anesthetic agents [J]. Br J Anaesth, 1986, 58(7): 701-716
- 4 Koehler A, Oertel R, Kirch W. Simultaneous determination of bupivacaine, mepivacain, prilocaine and ropivacain in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2005, 1088: 126-130
- 5 Tanaka E, Nakamura T. Simultaneous determination of three local anesthetic drugs from the pipercoloxylidide group in human serum by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B, 2006, 834: 213-216

(2010-10-27 收稿 2010-12-16 修回)