

气相色谱-质谱法同时测定透皮接收液中的 丙胺卡因和利多卡因

杨莹莹¹, 张文胜^{2*}, 叶利明^{1*}

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 四川大学华西医院麻醉与危重急救研究室, 四川 成都 610041)

摘要:建立了同时测定体外透皮接收液中丙胺卡因和利多卡因的气相色谱-质谱(GC-MS)分析方法。以罗哌卡因为内标,样品经氢氧化钠碱化、乙酸乙酯萃取后采用GC-MS分析,采用选择离子监测(SIM)模式进行定量分析。丙胺卡因和利多卡因两种药物均在0.016~50.0 mg/L范围内呈良好的线性关系,回收率为85.3%~109.7%,日内和日间测定的相对标准偏差均小于10%,检出限分别为3 μg/L和2 μg/L。该方法操作简便,选择性好,灵敏度高,适用于局部麻醉药物快速透皮吸收研究中丙胺卡因和利多卡因含量的分析。

关键词:气相色谱-质谱法;丙胺卡因;利多卡因;透皮吸收

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2009)01-0074-04 栏目类别:研究论文

Simultaneous determination of prilocaine and lidocaine in transdermal receiving fluid using gas chromatography- mass spectrometry

YANG Yingying¹, ZHANG Wensheng^{2*}, YE Liming^{1*}

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Laboratory of Anesthesia and Critical Care Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: A method for the simultaneous determination of prilocaine and lidocaine *in vitro* percutaneous absorption liquid using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) has been developed. Ropivacaine served as the internal standard. The sample was alkalinified with sodium hydroxide and a single-step liquid-liquid extraction with ethyl acetate. Selected ion monitoring (SIM) method was applied for the detection. Using the method to determine prilocaine and lidocaine in the rapid transdermal study. Prilocaine and lidocaine have good linear relationships in the concentration of 0.016 – 50.0 mg/L. The recoveries of prilocaine and lidocaine ranged from 85.3% to 109.7%, and the relative standard deviations of intra-day and inter-day were less than 10%. The limits of detection were 3 μg/L for prilocaine and 2 μg/L for lidocaine. This assay was time-saving, alternative and sensitive. It was suitable for the analysis of samples collected from the study on *in vitro* percutaneous absorption.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); prilocaine; lidocaine; percutaneous absorption

复方利多卡因乳膏(EMLA)是丙胺卡因和利多卡因的复方制剂,主要用于临床实践中的常规肌肉注射、静脉穿刺、各种内镜检查、皮肤表浅手术、烧伤清创换药及全麻气管插管时的表面麻醉。为研究超声波以及电渗作用对复方利多卡因乳膏经皮渗透的影响,需分析其体外经皮渗透扩散实验中透皮接收液中的药物含量。

关于测定生物样品中利多卡因的报道较多,而同时测定丙胺卡因和利多卡因的报道较少,主要有高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)。文献[1-3]采用HPLC测定血浆中利多卡因,Wei等^[4]采用HPLC测定猪体内渗透液中的丙胺卡因和利多卡因,但灵敏度都较低。Klein等^[5]以HPLC测定血浆中二者的含量,灵敏度较高。尉

* 通讯联系人:张文胜,副教授,硕士生导师。Tel:(028)85164039,E-mail:wensheng.zhang@yahoo.com.cn.

叶利明,副教授,硕士生导师。Tel:(028)85502305,E-mail:dryelimin@sohu.com.

志文等^[6]、吴惠勤等^[7]采用 GC-MS 测定生物样品中利多卡因,但操作均复杂耗时。Tomohiko 等^[8]和 Tohru 等^[9]经固相微萃取或固相萃取处理后采用 GC-MS 测定血浆中二者的含量,但耗时长、成本高。本实验采用 GC-MS 技术,建立了同时测定体外透皮接收液中丙胺卡因和利多卡因的方法,灵敏度高,且操作简便、选择性好,并已成功应用于超声波和电渗作用对局部麻醉药物的快速透皮吸收的影响研究中,较好地满足了该研究的需求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

6890-5973N 型气相色谱-质谱联用仪、7683B 型自动进样器(美国 Agilent 公司);Biofuge Primo 高速离心机(德国 Kendro 公司);MSI Minishake 旋涡混合器(德国 IKA 公司);Milli-Q 纯水机(美国 Millipore 公司);ME215S 电子天平(德国 Sartorius 公司);TT-6 透皮吸收仪(天津正通科技有限公司);Seven Multi 便携式 pH 计(德国 Mettler-Toledo 公司)。丙胺卡因对照品、利多卡因对照品(美国 Sigma 公司);罗哌卡因对照品(瑞典阿斯利康公司);复方利多卡因乳膏(瑞典阿斯利康公司);乙酸乙酯、甲醇为色谱纯(美国 Tedia 公司);乙醇、氢氧化钠为国产分析纯;水为去离子纯化水;空白透皮接收液为含 5% 乙醇的磷酸盐缓冲液(pH 7.4) (PBS)。

1.2 溶液的配制

1.2.1 标准储备液及工作溶液的配制

精密称取丙胺卡因、利多卡因对照品各 10 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得 1.0 g/L 的混合标准储备液,于 4 °C 下保存备用。

精密量取混合标准储备液适量,用甲醇配制成 200, 50, 12.5, 3.12, 0.78, 0.20, 0.06 mg/L 的混合标准液,于 4 °C 下保存备用。

1.2.2 内标溶液的配制

精密称取罗哌卡因对照品 10 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,得 1.0 g/L 的储备液。使用时用水稀释至 4.5 mg/L 作为内标溶液,于 4 °C 下保存备用。

1.3 体外透皮实验及样品处理

1.3.1 离体皮肤的制备

取 200 ~ 350 g、腹部皮肤无病变的大鼠,腹腔注射 30 g/L 的戊巴比妥麻醉,起效后心脏内注射空气处死。死后在腹部划出所需大小皮肤的边界,用剪刀剪去该处毛。用剪刀沿划线剪开皮肤,钝性分离,然后用棉签擦去皮肤上的筋膜、脂肪等皮下组织,将皮肤置于 PBS 液中,并于 0.5 h 内使用。

1.3.2 体外透皮实验步骤

在皮肤角质层面涂布药物 0.2 g(面积为 0.64 cm²),角质面向供给池(扩散池分接收池和供给池)固定于接收池和供给池中。接收池置于 37 °C 恒温水浴中,池中充满空白透皮接收液(5 mL)。以 300 r/min 的速度持续磁力搅拌池内液体。涂药后第 10, 30, 60 min 分别从接收池中取 0.5 mL 液体,于 -20 °C 下保存,用于 GC-MS 分析。抽取液体后立即向接受池中补充等体积的空白透皮接收液。

1.3.3 透皮吸收样品的处理

取透皮接收液样品 200 μL,置于离心管中,加入罗哌卡因内标溶液 50 μL 及 1 mol/L 的 NaOH 200 μL,混匀后加 1 mL 乙酸乙酯,混旋萃取 30 s,于 3 500 r/min 速率下离心 5 min,取上清液进行 GC-MS 测定,用工作曲线法计算含量。

1.4 GC-MS 条件

色谱柱:HP-5MS 毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm);进样口温度:270 °C;载气:高纯氢(99.999%),流速:1 mL/min,不分流进样,进样量 2 μL;柱温升温程序:起始 100 °C,保持 1 min,以 15 °C/min 速率升至 250 °C,保持 2 min。

电子轰击(EI)离子源,电离电压 70 eV;离子源温度 250 °C;四极杆温度 150 °C;接口温度 280 °C;选择离子监测(SIM)模式,溶剂延迟 9 min。根据丙胺卡因、利多卡因和罗哌卡因的扫描质谱图,选择 m/z 86 监测丙胺卡因和利多卡因,选择 m/z 126 监测罗哌卡因。

2 结果与讨论

2.1 萃取条件的选择

大多数局部麻醉药属于弱碱性胺类^[10],通常以盐形式存在,因此样品需碱化后使目标物游离才能进行有效的提取。碱化试剂及其 pH 值对该类药的提取回收率有较大的影响,本文考察比较了 pH 分别为 8, 10, 13 的碱化试剂,最后选用 pH 为 13 的 1 mol/L 的 NaOH 为提取溶剂,其萃取效率较高且配制简便。

2.2 色谱条件的选择

本文曾试验以 120 °C 为起始温度、升温速率为 20 °C/min 的条件进行 GC 分析,但在此条件下丙胺卡因与利多卡因不能完全分离,且罗哌卡因与一未知峰未完全分离;而将升温速率改为 10 °C/min 后,各峰拖尾现象严重。经多次实验,将起始温度改为 100 °C、升温速率改为 15 °C/min 后,以上状况得到了明显的改善,最后选用“1.4”节的色谱条件,各峰峰形和分离情况均较好,且不受杂质干扰。图 1 为

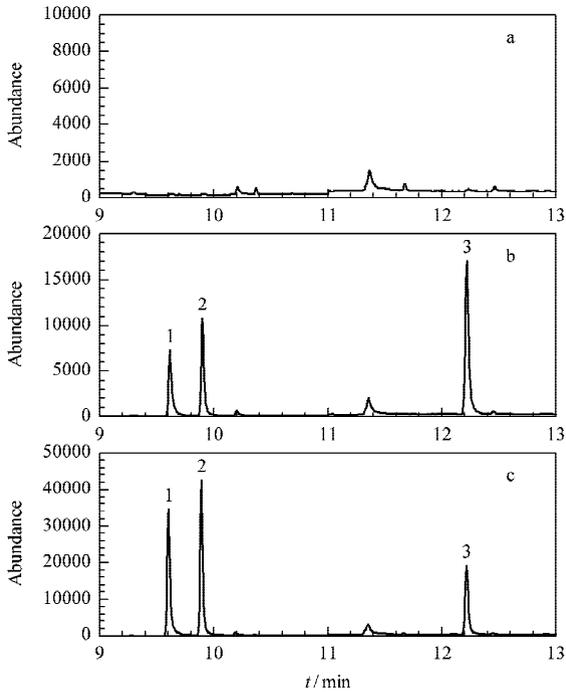


图 1 (a) 空白透皮接收液、(b) 加标空白透皮接收液和 (c) 透皮接收液样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of (a) blank receiving fluid, (b) blank sample of receiving fluid spiked with standards and (c) a real receiving fluid sample

1. prilocaine; 2. lidocaine; 3. ropivacaine.

空白透皮接收液、加标空白透皮接收液和透皮接收液样品的色谱图,由图 1 可见空白透皮接收液中其他成分对测定没有干扰,且丙胺卡因、利多卡因和罗哌卡因三者分离效果良好,保留时间分别为 9.6, 9.9 和 12.2 min。

2.3 提取回收率

以空白透皮接收液配制低、中、高 3 个质量浓度(分别为 0.049, 0.78, 12.5 mg/L)的质量控制(QC)样品各 6 份,每种浓度的 5 份样品经“1.3.2”节的方法处理后进样分析,计算提取后的目标组分的色谱峰面积与未经提取直接进样获得的目标组分的色谱峰面积之比,考察样品的提取回收率。3 个质量浓度水平下丙胺卡因和利多卡因的萃取回收率分别为 85.3%~89.5% 和 87.2%~91.5%(见表 1);内标溶液(质量浓度为 4.5 mg/L)经同法提取处理,其萃取回收率为 93.2%。

表 1 分析物的萃取回收率($n=5$)

Table 1 Extraction recoveries of analytes ($n=5$)

Analyte	$\rho(\text{Analyte})/(\text{mg/L})$	Extraction recovery/%
Prilocaine	12.5	85.3
	0.78	88.6
	0.049	89.5
Lidocaine	12.5	87.2
	0.78	89.8
	0.049	91.5

2.4 线性范围和检出限

取空白透皮接收液 200 μL ,分别加入罗哌卡因内标溶液 50 μL 、丙胺卡因和利多卡因混合标准液 50 μL ,配制成质量浓度为 0.016, 0.049, 0.20, 0.78, 3.12, 12.5, 50.0 mg/L 的样品,按上述方法处理及分析。用加权最小二乘法进行回归,得到丙胺卡因的回归方程为 $Y = 0.4983X + 0.0049$,利多卡因的回归方程为 $Y = 0.6261X - 0.0058$,其中 Y 为分析物与内标的峰面积比, X 为分析物的质量浓度(mg/L);两者的线性范围均为 0.016~50.0 mg/L,相关系数 r 均大于 0.998。以信噪比为 3 计,丙胺卡因和利多卡因检出限分别为 3 $\mu\text{g/L}$ 和 2 $\mu\text{g/L}$ 。

2.5 精密度和准确度

取空白接收液 200 μL ,配制高、中、低 3 个质量浓度(分别为 0.049, 0.78, 12.5 mg/L)的 QC 样品,每一质量浓度水平配制 6 份,按上述方法处理及分析。连续测定 5 d,以当日的标准曲线计算 QC 样品的质量浓度,计算得出方法的精密度的(用相对标准偏差(RSD)表示)和准确度(用方法的回收率表示)结果见表 2。

表 2 分析物测定的精密度和准确度

Table 2 Precisions and accuracies for the determination of analytes

Analyte	$\rho(\text{Analyte})/(\text{mg/L})$	RSD/%		Recovery/%
		intra-day ($n=6$)	inter-day ($n=5$)	
Prilocaine	12.5	1.22	4.87	109.7
	0.78	1.31	7.93	101.0
	0.049	5.58	9.85	85.3
Lidocaine	12.5	0.92	4.77	106.6
	0.78	1.22	7.22	103.2
	0.049	5.41	8.80	91.6

2.6 稳定性试验

取低、中、高 3 个质量浓度(分别为 0.049, 0.78, 12.5 mg/L)的 QC 样品各 3 份进行稳定性考察。分别考察各样品在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存不同时间(10, 30 和 60 d)、室温放置 7 h、反复冻融 3 次及按“1.3.2”节的方法处理后室温放置 12 h 后的稳定性。结果表明样品中丙胺卡因和利多卡因在上述条件下稳定性良好,回收率为 91.8%~109.6%,各组的 RSD 均小于 10%(见表 3)。

2.7 样品测定

取 200~350 g、腹部皮肤无病变的大鼠 18 只,雌雄各半,随机分为 3 组,每组 6 只,分别为 EMLA 乳膏组、EMLA 联合超声预处理组和 EMLA 联合离子电渗组。EMLA 乳膏组即离体皮肤不经任何物理处理直接进行体外透皮实验。EMLA 联合超声预处理组即离体皮肤经超声处理 10 min 后再进行体外

透皮实验。而 EMLA 联合离子电渗组为体外透皮实验开始计时的同时经电渗处理 10 min。取涂药后的第 10、30、60 min 的样品进行 GC-MS 分析。各

组接受液中利多卡因和丙胺卡因的平均药物浓度-时间曲线见图 2。结果显示两种处理方法均可提高皮肤通透性,增强药物的渗透。

表 3 透皮接收液中丙胺卡因和利多卡因在长期冰冻、室温放置、处理后放置和反复冻融条件下的稳定性($n=3$)
Table 3 Stabilities of prilocaine and lidocaine in receiving fluid under the conditions of long term, room temperature, storage after processing (extracted sample) and freezing-thawing ($n=3$) mg/L

Analyte	ρ (Analyte) / (mg/L)	-20 °C			Kept for 7 h at room temperature	Kept for 12 h after processing	Repeated freezing-thawing for 3 times
		10 d	30 d	60 d			
Prilocaine	12.5	13.7	12.4	13.4	13.7	13.6	13.5
	0.78	0.81	0.75	0.85	0.77	0.81	0.78
	0.049	0.052	0.049	0.052	0.053	0.052	0.053
Lidocaine	12.5	13.6	11.9	13.2	13.1	13.1	13.4
	0.78	0.79	0.72	0.8	0.77	0.75	0.78
	0.049	0.053	0.045	0.045	0.047	0.046	0.045

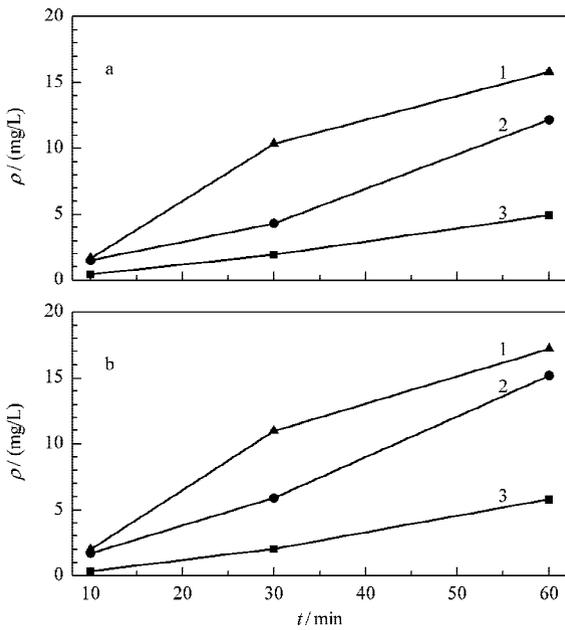


图 2 透皮接收液中(a)利多卡因和(b)丙胺卡因的质量浓度-时间曲线

Fig. 2 Mass concentration-time curves of (a) lidocaine and (b) prilocaine in transdermal receiving fluid

1. combination of EMLA cream and iontophoresis group ;
2. combination of EMLA cream and ultrasound pretreatment group ;
3. EMLA cream group.

3 结论

本文建立了同时测定体外透皮接收液中利多卡

因和丙胺卡因的气相色谱-质谱分析方法。该方法样品用量少,操作简单、快速,且重现性好,检出限和线性范围均可以满足实际样品测定的要求,为局部麻醉药物快速透皮吸收的研究提供了可靠的依据。

参考文献:

- [1] Zhang X N, Zhang G H, Zhang Y F. China Journal of Clinical Pharmacy (张晓楠, 张贵和, 张延凤. 中国临床药理学杂志), 1999, 8 : 52
- [2] Chen L L, Liao L C, Zuo Z. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43 : 1 757
- [3] Gong S C, Wang Q Z, Zhan Y N. China Journal of Hospital Pharmacy (龚善初, 王乾洲, 詹元年. 中国医院药理学杂志), 2000, 20(7) : 405
- [4] Wei H L, Chen Y, Xu L F, et al. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(4) : 830
- [5] Klein J, Fernandes D, Gazarian M, et al. J Chromatogr B, 1994, 655(1) : 83
- [6] Wei Z W, Fu K M, Zhang N, et al. Journal of Forensic Medicine (尉志文, 负克明, 张楠, 等. 法医学杂志), 2005, 21 (2) : 124
- [7] Wu H Q, Jin Y C, Cai M Z. Chinese Journal of Analytical Chemistry (吴惠勤, 金永春, 蔡明招. 分析化学), 2007, 35 (4) : 500
- [8] Tomohiko W, Akira N, Mikio Y. J Chromatogr B, 1998, 709 : 225
- [9] Tohru O, Tatsunori T. J Chromatogr B, 1999, 726 : 185
- [10] Liu J J, Zhao J. Modern anesthesiology. 2nd ed. Beijing : People's Health Press (刘俊杰, 赵俊. 现代麻醉学. 2 版. 北京 : 人民卫生出版社), 1997 : 298