

ĐỊNH LƯỢNG THUỐC GÂY TÊ ROPIVACAIN TRONG HUYẾT THANH BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ

Trịnh Minh Việt*

TÓM TẮT

Mục tiêu: “Phát triển phương pháp phân tích nhanh, có độ nhạy, độ chính xác cao để định lượng ROP huyết thanh bằng HPLC-MS”. Đối tượng và phương pháp: Mẫu chuẩn ropivacain pha trong huyết thanh trắng (n=10), mẫu kiểm tra chất lượng (QC) chứa ROP ở 3 mức nồng độ (n=6); mẫu thử là huyết thanh bệnh nhân sau phẫu thuật gây tê ngoài màng cứng (n=30). Phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (liquid chromatography–mass spectrometry: HPLC-MS) sử dụng nguồn ion hóa phun điện tử (Electrospray ionization-ESI) với chế độ giám sát nhiều phản ứng (multiple reaction monitoring - MRM) để định lượng ROP huyết thanh. Các mẫu được pha vào dung dịch đệm chiết, ly tâm, lọc và phân tích trên cột Zobax và nhận diện bằng đầu dò khối phổ theo các mảnh ion đặc trưng: m/z 275,3-> 126,2 đối với ROP; m/z 290,2-> 198,2 với diazepam-d5. Kết quả: Phương pháp cho độ tuyến tính cao trong khoảng đo 0,1–10 µg/mL và giới hạn định lượng thấp là 0,1 µg/mL. Độ chính xác dao động trong khoảng 96,76 – 102,48%, hiệu suất chiết cao từ 94,88-98,85%. Lượng mẫu yêu cầu thấp (10µL), độ đặc hiệu cao và thời gian phân tích ngắn (6 phút) nên rất thích hợp để xác định ROP huyết thanh cho bệnh nhân nghi ngờ ngộ độc thuốc.

Từ khóa: Thuốc tê, ropivacain, huyết thanh, sắc ký lỏng - khối phổ

SUMMARY

DETERMINATION OF ROPIVACAIN IN SERUM USING LIQUID CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY

Objective: “Develop a fast, sensitive, and highly accurate analytical method for the quantification of serum ROP by HPLC-MS”. **Subjects and methods:** Standard sample ropivacaine mixed in white serum (n=10), quality control sample (QC) containing ROP at 3 lever concentrations (n=6); Samples were serum from patients after epidural surgery (n=30). Liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC-MS) used an electron spray ionization (ESI) source with multiple reaction monitoring (MRM) for determination. serum ROP. Samples were mixed into extraction buffer, centrifuged, filtered and analyzed on a Zobax column and identified by mass spectrometry probe according to characteristic ion fragments: m/z 275.3-> 126.2 for ROP; m/z 290.2->198.2 with diazepam-d5. **RESULTS:** The method showed high linearity over the measuring range 0.1–10 µg/mL and a low limit of quantification of 0.1 µg/mL. The accuracy ranges from 96.76 to 102.48%, the extraction efficiency is from 94.88 to 98.85%. The low sample volume required (10 µL), high specificity and short analysis time (6 minutes) make it very suitable for determining serum ROP for patients with suspected drug toxicity.

*Viện 69

Chịu trách nhiệm chính: Trịnh Minh Việt

Email: Dr.minhviet@gmail.com

Ngày nhận bài: 13.8.2022

Ngày phản biện khoa học: 22.9.2022

Ngày duyệt bài: 24.9.2022

Keywords: Local anesthetic, ropivacaine, serum, liquid chromatography - mass spectrometry

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

ROP là thuốc gây tê cục bộ dạng amide tác dụng kéo dài được sử dụng ở nồng độ cao để gây tê phẫu thuật và nồng độ thấp hơn để giảm đau sau phẫu thuật[5]. Nó tương tự như bupivacain về mặt hóa học [1] nhưng độc tính của ROP đối với hệ tim mạch ít hơn so với các thuốc gây mê khác vì ái lực của nó với các kênh natri trong tim thấp[7]. Vì vậy, ROP một được sử dụng phổ biến trong lâm sàng, chủ yếu để gây tê vùng, gây tê ngoài màng cứng, giảm đau sau phẫu thuật hoặc chuyên dạ [4]. Tuy nhiên, cũng có những tác dụng không mong muốn như hạ huyết áp, giảm nhịp tim, buồn nôn... đặc biệt nguy hiểm khi nồng độ ROP quá cao trong huyết thanh có thể gây tử vong cho bệnh nhân. Do đó, một kỹ thuật phân tích nhanh chóng và chính xác để xác định nồng độ của ROP trong huyết thanh là rất cần thiết.

Hiện nay, các phương pháp phân tích ROP huyết thanh chủ yếu dựa trên việc chuẩn bị mẫu bằng chiết lỏng/lỏng, kết tủa protein, pha rắn, chiết vi pha rắn [2]... hạn chế của các phương pháp này là cần lượng mẫu lớn, kỹ thuật làm sạch phức tạp, tốn nhiều thời gian và khó tự động hóa. Ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào định lượng ROP trong huyết thanh bằng HPLC-MS. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục đích “phát triển phương pháp phân tích nhanh, có độ nhạy, độ chính xác cao để định lượng ROP huyết thanh bằng HPLC-MS” giúp chẩn đoán chính xác những bệnh nhân

có các triệu chứng nghi ngờ ngộ độc ROP quá liều

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng:

- Mẫu ROP chuẩn, huyết thanh trắng (n=10) (là huyết thanh bệnh nhân khỏe mạnh không sử dụng thuốc ROP), các mẫu kiểm tra chất lượng chứa ROP ở 3 mức nồng độ thấp, trung bình và cao (n=6).

- Mẫu thử: Huyết thanh bệnh nhân sau gây tê ngoài màng cứng bằng ROP (n=30)

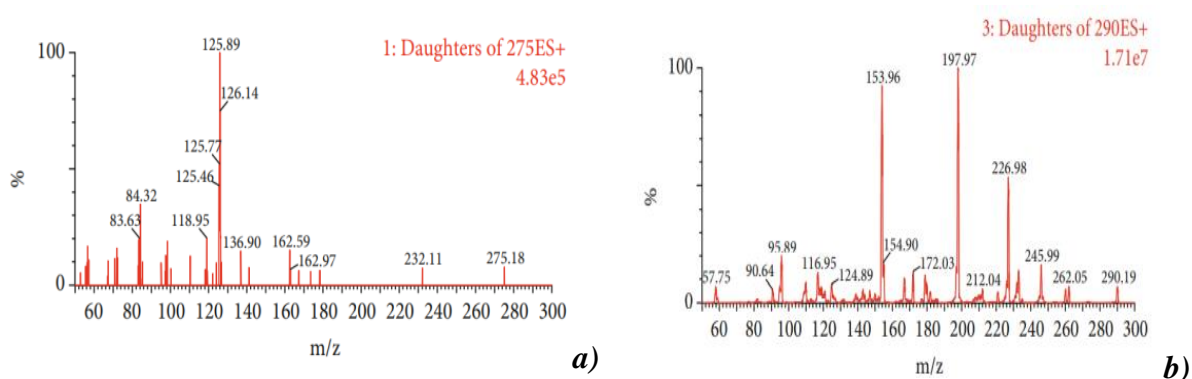
2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hóa chất

ROP và diazepam-d5 (nội chuẩn-IS) tinh khiết > 98%, của Sigma-Aldrich Co. LLC – Mỹ. Acetonitril và metanol (loại HPLC) của Merck (Darmstadt, Đức). Nước tinh khiết (18,2M) chuẩn bị trên hệ thống Elga Centra RDS

2.2.2. Dụng cụ và phương pháp

Hệ thống sắc ký lỏng Agilent 1290 ghép đầu dò khối phổ Agilent 6430 Triple Quadrupole (Agilent – Mỹ). Cột Zobax C18 4,6x50mm x 5 μ m (Agilent – Mỹ) được sử dụng làm pha tĩnh và nhiệt độ cột đặt ở 30°C. Pha động là axetonitril chứa 0,1% axit formic (FA) / trong nước chứa 0,1% FA, rửa giải bằng gradien với tốc độ dòng 0,2 mL/phút. Điều kiện khối phổ: Khí nito 6L/phút, điện áp mao quản 1000 V và nhiệt độ khử ẩm là 300° C, chế độ quét MRM. Các mảnh phổ chọn như sau: m/z 275,3-> 126,2 (định lượng) và m/z 275,3-->84.3 (định tính) đối với ROP m/z 290,2-> 198,2 (định lượng) và 290,2-> 154.0 (định tính) cho diazepam-d5 (Hình 1).



Hình 1: Khối phổ của ROP (a) và diazepam-d5 (b)

Chọn diazepam-d5 là chất nội chuẩn vì trong cùng điều kiện sắc ký, diazepam-d5 được tách hoàn toàn, có thời gian lưu gần với thời gian lưu của roipi trong mẫu thử và có cấu trúc hóa học tương tự như chất thử.

2.2.3. Chuẩn bị mẫu đường chuẩn và các mẫu kiểm tra

Dung dịch gốc của ROP (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và diazepam-d5 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pha loãng bằng methanol, bảo quản ở 4°C cho tới khi sử dụng. Đường chuẩn bao gồm: 01 mẫu huyết thanh trắng (blank) và 08 mẫu huyết thanh có pha chuẩn roipi có nồng độ từ 0,1 – 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Các mẫu kiểm tra (QC) với 3 mức nồng độ: Lower Quality Control Sample (LQC- 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Middle Quality Control Sample (MQC-4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), High Quality Control Sample (HQC - 8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$); được chuẩn bị từ dung dịch chuẩn gốc độc lập.

2.2.4. Xử lý mẫu

Huyết thanh (10 μL), acetonitril (1 mL) được thêm vào ống ly tâm 2 mL, sau đó được lắc trộn trong 1,0 phút. Sau khi ly tâm (6000 vòng/phút, 4°C, 10 phút), hút pha nổi phía trên lọc qua màng lọc 0,45 μm bằng bơm tiêm PolyTetraFluoroEthylene (PTFE), vào lọ 2 mL để phân tích sắc ký

2.2.5. Thẩm định phương pháp

Theo hướng dẫn “Quy trình thẩm định phương pháp phân tích mẫu sinh học của Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (US-FDA)” [3]

3. Kết quả và bàn luận

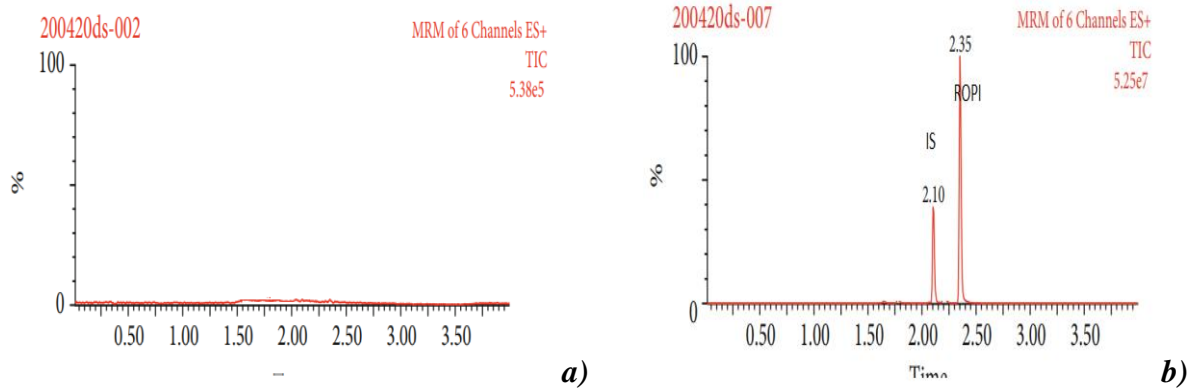
3.1. Xây dựng phương pháp

Đã tối ưu hóa các điều kiện sắc ký về tỷ lệ pha động, chế độ dung môi, lựa chọn cột phù hợp để có thể rửa giải ROP khỏi những chất phức tạp khác trong nền mẫu huyết thanh [8]. Đã tiến hành khảo sát và so sánh hiệu quả tách chiết của một loạt các chế độ dung môi khác nhau như: metanol hoặc axetonitril (chứa 0,1% axit fomic), dung dịch đệm amoni axetat 10mmol/L (chứa 0,1% FA) trong axetonitril hoặc metanol, và 10mmol/L amoni dung dịch đệm axetat (chứa 0,05% FA) trong metanol hoặc axetonitril. Dưới sự so sánh toàn diện, hiệu ứng rửa giải gradient của dung dịch đệm amoni axetat 10mmol/L (chứa 0,1% FA) trong axetonitril cho kết quả tốt nhất, hình dạng pic của ROP không bị rộng và không bị chồng lấn với các pic của các tạp chất khác.

3.2. Xác thực phương pháp

3.2.1. Tính chọn lọc - đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu huyết thanh trắng và huyết thanh có thêm chuẩn ROP thu được kết quả như sau.



Hình 2: Sắc ký đồ của ropivacin và nội chuẩn trong huyết thanh. (a) Huyết thanh trắng. (b) Huyết thanh có thêm chuẩn ROP và nội chuẩn

Nhận xét: Trong sắc ký đồ mẫu huyết thanh trắng không xuất hiện pic ROP và nội chuẩn, mẫu huyết thanh có thêm chuẩn và IS xuất hiện pic ROP và IS có thời gian lưu 2,35 phút và 2,1 phút, pic cân đối, tín hiệu cao, không bị chồng lấn, không có sự ảnh hưởng của các thành phần phức tạp trong mẫu huyết thanh...

Theo qui định, phương pháp có độ chọn lọc-đặc hiệu thì ngoài khả năng nhận diện và phân biệt được hoạt chất như đã xác định ở trên, đáp ứng của mẫu trắng tại thời điểm trùng với thời gian lưu của ROP và IS đạt yêu cầu (đều bằng 0%) không vượt quá 5%, chứng tỏ phương pháp có độ chọn lọc và độ đặc hiệu cao.

3.2.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Bảng 3.1. Kết quả thẩm định đường chuẩn

Nồng độ (µg/mL)	Độ đúng (%)				
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5
Phương trình hồi quy (Y = aX + b)	a = 0,1453	a = 0,1497	a = 0,1503	a = 0,1458	a = 0,1489
	b = -0,0008	b = -0,0008	b = -0,0013	b = -0,0004	b = -0,0006
	r = 0,9999	r = 0,9996	r = 0,9992	r = 0,9997	r = 0,9988

(Y: tỷ lệ đáp ứng pic ROP; X: nồng độ ROP trong mẫu huyết thanh)

Như vậy, tất cả các điểm của đường chuẩn đều có độ đúng từ 85-115%. Và hệ số tương quan r của cả 5 đường chuẩn đều lớn hơn 0,99. Do đó trong khoảng nồng độ từ 0,1 – 10,0 µg/mL có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ ROP trong huyết thanh với tỷ lệ diện tích pic ROP thu được

3.2.3. Giới hạn định lượng dưới

Bảng 3.2. Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới

STT	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn (≈ 0,1 µg/mL)				
	ROP (mAu.s)	ROP (mAu.s)	IS (mAu.s)	Nồng độ tìm thấy ^(a) (µg/mL)	Độ đúng ^(b) (%)	Đạt/Không đạt
TB (n=6)	0	1234734	66652	0,094	93,93	
CV (%)				2,8	2,8	Đạt

(a): tính từ phương trình hồi quy (b): % so với nồng độ thực, (+): không xác định

Phương pháp đạt được độ đúng so với nồng độ thực là (91,91–98,98%), độ chính xác với giá trị CV% ≤ 20% (2,9%). Vậy, chuẩn ROP có nồng độ 0,1 µg/mL đáp ứng

yêu cầu Lower Limit Of Quantification (LLOQ) về độ đúng, độ chính xác.

3.3.4. Độ đúng – độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Pha mỗi loại QC gồm ít nhất 6 mẫu độc lập có cùng nồng độ. Tiến hành xử lý mẫu và sắc ký theo các điều kiện đã lựa chọn.

Bảng 3.3. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại

Ngày	LQC (0,3 µg/mL)		MQC (4,0 µg/mL)		HQC (8,0 µg/mL)	
	Độ đúng ^(b) (%)	CV (%)	Độ đúng ^(b) (%)	CV (%)	Độ đúng ^(b) (%)	CV (%)
Ngày 1 (n=6)	99,02	4,01	100,14	5,05	100,64	5,95
Ngày 2 (n=6)	99,9	3,93	98,2	4,34	91,71	6,34
Ngày 3 (n=6)	89,7	3,78	94,43	6,42	92,72	4,01
TB	96,2	3,91	97,59	5,27	95,03	5,43

(b) % so với nồng độ thực

Độ đúng trong ngày tốt nằm trong khoảng 96,76 – 102,48%, độ lệch nằm trong giới hạn cho phép ± 15%, độ lặp lại trong ngày với giá trị CV% nhỏ (3,78 – 6,34%); độ đúng trong các ngày trong khoảng 85% đến 115%, độ lặp lại khác ngày với giá trị CV% (3,91 – 5,43%) chứng tỏ phương pháp được nghiên cứu có độ đúng, độ chính xác cao.

3.2.6. Tỷ lệ thu hồi của phương pháp

Bảng 3.4. Kết quả thẩm định tỷ lệ thu hồi ROP trong huyết thanh

STT	Đáp ứng ROP (mAu.s)					
	LQC (≈ 0,3 µg/mL)		MQC (≈ 4,0 µg/mL)		HQC (≈ 8,0 µg/mL)	
	Huyết thanh	Pha động	Huyết thanh	Pha động	Huyết thanh	Pha động
TB(n=6)	60608	63878.13	816030	839285	1641026	1660164.37
CV(%)	5,7	0,3	1,5	0,5	1,5	0,1
Tỷ lệ thu hồi (%)	94,88		97,23		98,85	

Cả 3 khoảng nồng độ (0,3; 4,0; 8,0µg/mL), đều cho hiệu suất chiết nằm trong khoảng 30 – 110% (94,88%; 97,23%; 98,85%), giá trị CV% mỗi nồng độ của ROP đều ≤ 15% (từ 0,1% – 5,7%). Do đó phương pháp xử lý mẫu đã được xây dựng là phù hợp để chiết tách ROP từ huyết thanh.

3.2.7. Độ ổn định

Phân tích ba điều kiện ổn định, bao gồm nhiệt độ phòng trong 2 giờ; -20°C trong 30 ngày và 3 chu kỳ đông lạnh và rã đông, độ chính xác của ROP trong huyết thanh là từ 85% đến 109% và RSD nằm trong khoảng 12%. Những kết quả này chỉ ra rằng ROP đều ổn định.

IV. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, xây dựng được quy trình phân tích ROP trong huyết thanh một cách tương đối hoàn thiện bao gồm xử lý mẫu và tối ưu hoá điều kiện sắc ký lỏng khối phổ, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu/chọn lọc cao, khoảng tuyến tính 0,1-10 µg/mL), giới hạn định lượng dưới 0,1 µg/mL), độ đúng - độ lặp lại, tỷ lệ thu hồi, độ ổn định của ROP trong huyết thanh cao.

HPLC-MS có thời gian phân tích nhanh hơn và độ nhạy cao hơn HPLC truyền thống. Chỉ mất 6 phút để hoàn thành việc phân tích một mẫu huyết thanh, điều này có thể tiết kiệm đáng kể thời gian và nguồn lực.

KIẾN NGHỊ

Áp dụng xét nghiệm sớm cho các trường hợp bệnh nhân nghi ngờ ngộ độc ROP sau phẫu thuật, chẩn đoán phân biệt với các tai biến hậu phẫu khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Aarons, L, et al. (2011)**, "Population pharmacokinetic analysis of ROPE and its metabolite 2', 6'-pipercoloxylidide from pooled data in neonates, infants, and children", *British journal of anaesthesia*. 107(3), pp. 409-424.
2. **Cobb, Zoe and Andersson, Lars I (2005)**, "Determination of ROPE in human plasma using highly selective molecular imprint-based solid phase extraction and fast LC-MS analysis", *Analytical and bioanalytical chemistry*. 383(4), pp. 645-650.
3. **FDA, 2014**, <https://www.fda.gov/oc/ohrt/02/02-19-14-Guidance.pdf>. Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics
4. **Huang, Jiao and Liu, Jing-Chen (2020)**, "Ultrasound-guided erector spinae plane block for postoperative analgesia: a meta-analysis of randomized controlled trials", *BMC anesthesiology*. 20(1), pp. 1-8.
5. **Kuthiala, Gaurav and Chaudhary, Geeta (2011)**, "ROPE: A review of its pharmacology and clinical use", *Indian journal of anaesthesia*. 55(2), p. 104.
6. **Sawaki, Kohei, et al. (2009)**, "Evaluation of high-performance liquid chromatography and mass spectrometry method for pharmacokinetic study of local anesthetic ROPE in plasma", *Biomedical research*. 30(6), pp. 319-324.
7. **Simpson, Dene, et al. (2005)**, "ROPE", *Drugs*. 65(18), pp. 2675-2717.
8. **Wu, Haiya, et al. (2019)**, "Determination and pharmacokinetics and bioavailability of O-demethyl nuciferine in mice by UPLC-MS/MS", *Acta Chromatographica*. 31(3), pp. 222-227.