

液相微萃取-高效液相色谱法测定尿样中的利多卡因

康绍英 王海波 马 铭* 陈 波 姚守拙

(湖南师范大学化学研究所, 长沙 410081)

摘 要 应用液相微萃取与高效液相色谱联用技术快速分析尿样中的利多卡因。考察了萃取溶剂、体积、萃取时间及料液 pH 值对液相微萃取的影响,建立了液相微萃取与高效液相色谱联用技术分析尿样中利多卡因的方法。优化的实验条件为:料液 pH 值 12.0,萃取溶剂为 5 μ L 邻苯二甲酸二丁酯,萃取时间 40 min,搅拌速度 80 r/min。方法的线性范围为 0.2~5 mg/L,检出限为 0.1 mg/L,相对标准偏差小于 6.3%。通过液相微萃取后,能有效地去除检测尿样中利多卡因的干扰物质,获得了较高的选择性。该方法简便、快速、灵敏、消耗有机溶剂少,是尿样中利多卡因检测的一种有效方法。

关键词 利多卡因,液相微萃取,高效液相色谱

1 引 言

样品的前处理方法主要有液-液萃取、固相萃取、固相微萃取及膜萃取等^[1,2]。1996年 Cantwell 等提出了液相微萃取 (LPME) 技术^[1],因其萃取效率高、消耗有机溶剂少,且具有快速、灵敏等优点,近几年在国外发展迅速,主要用于分析环境水样中低浓度有机污染物^[3~6],但国内用该技术进行样品前处理的报道很少。

利多卡因 (lidocaine) 是临床应用较广的酰胺类局部麻醉药物之一,其有效浓度范围为 1~5 mg/L。当血药浓度超过 5 mg/L 时可发生惊厥等毒性反应,低于药用量的 10% 以原形随尿排出。因此,监测尿液中利多卡因的含量对指导临床合理用药和减少毒副反应有重要意义。有关高效液相色谱法 (HPLC) 测定人血清^[7~9]和脊髓^[10]中利多卡因浓度的方法均有报道。由于尿样本身在利多卡因出峰位置存在干扰峰,给 HPLC 方法直接检测尿样中利多卡因带来了困难,而利用液相微萃取技术处理尿样后不仅可以消除干扰,同时对利多卡因进行了富集,利用 LPME-HPLC 联用可以方便、准确地检出尿样中的利多卡因,提高了方法的灵敏度。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

大连江申高效液相色谱系统 (大连江申分离科学技术公司),由 LC-10P 泵、LC-10UV 检测器、7725 手动进样阀、25 μ L 微量进样器组成。盐酸利多卡因注射液 (湖南洞庭药业股份有限公司);乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 色谱条件

色谱柱: spherisorb C₈ 柱 (5 μ m, 200 mm $\times$ 4.6 mm i.d.) (大连江申分离科学技术公司),检测波长 254 nm,进样量 5 μ L。流动相: 400 mL 0.025 mol/L 三乙胺,以磷酸调 pH = 3,用 0.45 μ m 水膜过滤,与 100 mL 乙腈混匀,脱气 10 min 备用。

2.3 实验方法

在称量瓶中加入搅拌磁子和 6 mL pH 为 12.0 的分析液,用 25 μ L 微量进样器抽取 5 μ L 有机溶剂,将针尖浸入到料液中,按下微量进样器的活塞,使萃取溶剂形成一个小液滴悬挂在针尖上,溶液搅拌速度为 80 r/min,萃取 40 min 后,拉回活塞,直接进样分析。

2003-11-10 收稿; 2004-04-19 接受

本文系科技部国家“十五”重大科技专项 (No. 2003AA2Z3515)、湖南省杰出青年科学基金 (No. 03JJY1002)、湖南省自然科学基金 (No. 03JJY4009)、湖南省教育厅科学研究项目 (No. 02C215) 资助课题

3 结果与讨论

3.1 萃取溶剂的选择

考察了不干扰利多卡因检测的 11种有机溶剂,从浓缩比(萃取后有机液滴中利多卡因的浓度与原始料液中利多卡因的浓度之比)和液滴的稳定性两方面考虑选取萃取剂。实验发现:三氯甲烷、二氯甲烷、环己烷和正己烷的液滴明显溶胀,在不同时间液滴消失;正辛烷液滴溶解现象严重;正辛醇液滴在推出针筒的瞬间浮上液面;正癸醇液滴推出针筒后偏离针尖粘附在针筒外壁,无法收回。邻苯二甲酸二丁酯、邻二甲苯、对二甲苯、甲苯均可以作为利多卡因的萃取溶剂,它们的萃取效果如表 1。表 1说明,邻二甲苯、对二甲苯和甲苯作萃取溶剂时的浓缩比略高于以邻苯二甲酸二丁酯作溶剂时的浓缩比,但以邻二甲苯、对二甲苯和甲苯作萃取溶剂时,5次测定结果的相对标准偏差(RSD)分别为 15%、13%和 50%;而以邻苯二甲酸二丁酯作萃取溶剂时的 RSD为 3.1%,因此,邻苯二甲酸二丁酯作萃取溶剂。

表 1 有机溶剂对萃取效果的影响

Table 1 The effect of extraction solvents on the extraction efficiency

萃取溶剂 Extraction solvents	萃取时间 (min) Extraction time	浓缩比 Enrichment factor	萃取溶剂 Extraction solvents	萃取时间 (min) Extraction time	浓缩比 Enrichment factor
邻苯二甲酸二丁酯 Di-n-Butylphthalate	30	41.4	对二甲苯 p-Xylene	30	44.8
邻二甲苯 o-Xylene	30	50.4	甲苯 Toluene	30	55.7

3.2 溶剂体积对萃取效果的影响

不同体积的邻苯二甲酸二丁酯液滴萃取 30 min后进样分析,结果如表 2。表 2显示,萃取后利多卡因的峰面积随液滴体积的增大而增大。悬挂在料液相的有机液滴同时受重力、浮力和界面张力的作用。当这 3种力达到平衡时,有机液滴能稳定地悬挂在进样器针头上。对于一定大小的进样器针头和一定的有机相,液滴能够稳定悬挂的体积有一个极大值,超过了这个极大值,液滴便会向上或向下脱离针头。液滴体积越大,悬挂的稳定性越低,加大了实际操作的难度,本实验选取 5 μL 作为萃取液滴体积。

表 2 溶剂体积对萃取效果的影响

Table 2 The effect of the solvent volume on the extraction efficiency

溶剂体积 Solvent volume (μL)	1	2	3	4	5	6
峰面积 Peak area ($\times 10^4 \mu\text{V} \cdot \text{s}$)	0.53	1.56	2.30	3.27	3.95	4.07

3.3 萃取时间对萃取效果的影响

LPME是一个样品的富集平衡过程,萃取时间是非常重要的影响因素。本实验研究了萃取时间对利多卡因萃取的影响,结果见表 3。

由表 3可知,萃取后利多卡因的峰面积随萃取时间开始迅速增大,随后增大趋势减缓。实验发现,从 50 min开始,液滴有微量溶解现象,可能是液滴溶解导致峰面积增加趋势减缓。考虑到萃取时间的选择既要保证较高的灵敏度又要节约时间,本实验的萃取时间选择为 40 min。

表 3 萃取时间对萃取效果的影响

Table 3 The extraction time on the extraction efficiency

萃取时间 Extraction time (min)	5	10	20	30	40	50	60
峰面积 Peak area ($\times 10^4 \mu\text{V} \cdot \text{s}$)	0.80	1.26	2.71	3.95	5.59	6.84	7.58

3.4 pH 值对萃取效果的影响

利多卡因是碱性药物, pK_a 值为 7.9。在溶液 pH 值高于 pK_a 值时,利多卡因会以中性分子的形式被萃取到有机液滴中。本实验研究了溶液 pH 值对萃取效果的影响,结果表明,随着料液 pH 值的升高,利多卡因的萃取效率先增加后减少,当 pH 值为 12.0时萃取效率最大。

3.5 方法的线性范围、检出限和精密度

在优化条件下,对浓度为 0.2 0.3 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0和 5.0 mg/L的利多卡因标准溶液系列萃取后进样分析。结果表明,利多卡因的色谱峰面积在所测浓度范围内与浓度呈良好的线性关系,回归方

程为 $y = 30543.58x + 586.72$, 相关系数为 0.9967, 检出限为 0.1 mg/L; RSD 小于 6.3% ($n=5$)。对浓度为 0.4 和 0.8 mg/L 的两个样品的回收率进行了考察, 其回收率分别为 98.5% 和 97.0%。

3.6 实际尿样的检测

取 5 μ L 空白尿样和 20 μ L 10 mg/L 标准利多卡因溶液进样分析 (如图 1), 图 1 表明, 尿样在利多卡因的出峰位置有干扰峰。空白尿样和含利多卡因 2 mg/L 的尿样的萃取色谱图见图 2。图 2 显示尿样中的成分不会被萃取到有机液滴中, 而且该 LPME 技术可以选择性地、高效地富集尿样中的利多卡因。测得样品的回收率为 90.2%。

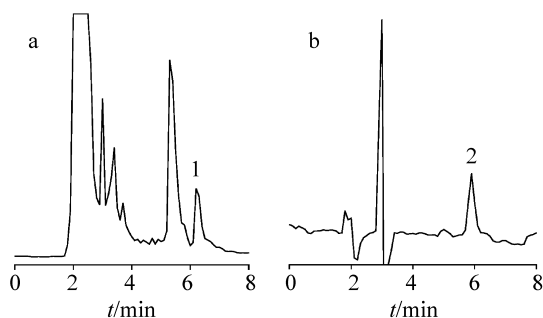


图 1 空白女性尿液和标准品的色谱图

Fig.1 Chromatogram of blank female urine and standard sample

a. 空白女性尿液 (blank female urine); b. 标准品 (standard sample)。1. 干扰峰 (interferential peak); 2. 利多卡因 (lidocaine)。

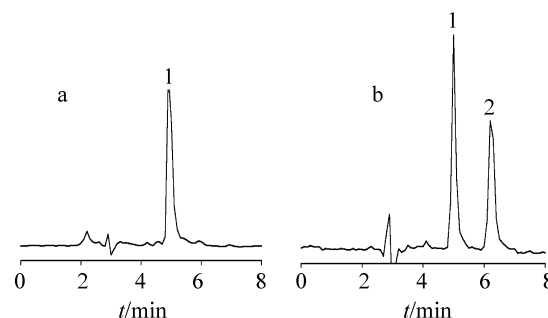


图 2 空白女性尿液和含利多卡因的女性尿样的液相微萃取色谱图

Fig. 2 Chromatogram of liquid phase microextraction (LPME) from blank female urine and spiked female urine sample containing lidocaine

a. 空白女性尿液的液相微萃取 (LPME for blank female urine); b. 含利多卡因的女性尿样的液相微萃取 (LPME for spiked female urine sample containing lidocaine)。1. 溶剂峰 (peak of solvent); 2. 利多卡因 (lidocaine)。

References

- 1 Zhang Yueqin (张月琴), Wu Shuqi (吴淑琪). Journal of Instrumental Analysis (分析测试学报), 2003, 22(3): 106 ~ 109
- 2 Lu Feng (陆峰), Lin Peiyong (林培英), Yang Genjin (杨根金). The Journal of Pharmaceutical Practice (药学实践杂志), 2002, 20(2): 91 ~ 94
- 3 Wang Y, Kwok Y C, He Y, Lee H K. Anal. Chem., 1998, 70(21): 4610 ~ 4614
- 4 Shen G, Lee H K. Anal. Chem., 2003, 75(1): 98 ~ 103
- 5 Zhao L, Lee H K. J. Chromatogr. A, 2001, 919(2): 381 ~ 388
- 6 Psillakis E, Kalogerakis N. J. Chromatogr. A, 2003, 999(1-2): 145 ~ 153
- 7 Wang Xiuying (王秀英). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 1994, 22(6): 644
- 8 Li Xia (李霞), Yuan Libin (袁立斌), Zhao Qigang (赵歧刚). Chinese Pharmaceutical Affairs (中国药事), 1998, 12(6): 372
- 9 Sun Xin (孙昕), Zhou Yixian (周义先). Acta Universitatis Medicinalis Anhui (安徽医科大学学报), 1998, 33(1): 69 ~ 70
- 10 Jin Ming (金鸣), Wu Guibao (吴贵宝), Yang Delong (杨德隆). Journal of Forensic Medicine (法医学杂志), 2000, 16(3): 153 ~ 154

Determination of Lidocaine in Urine by Liquid Phase Microextraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography

Kang Shaojing, Wang Haibo, Ma Ming*, Chen Bo, Yao Shouzhao
(Chemical Research Institute of Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract A novel method for the determination of lidocaine in urine by liquid phase microextraction (LPME) coupled with high performance liquid chromatography was developed. Extraction solvent, extraction time, solvent volume, and pH were optimized. Optimal experimental conditions were as follows: 12.0 of pH value in the feed solution, 5 μL of di-n-butylphthalate as the extraction solvent, 40 min of extraction time, and 80 r/min of stirring speed. The linear range was from 0.2 mg/L to 5 mg/L, the detection limit was 0.1 mg/L, and the relative standard deviation was lower than 6.3%. With LPME, some substances in urine which interfered the determination of lidocaine were eliminated efficiently, and the higher selectivity was obtained. The method with little solvent consumption was simple, fast, sensitive and suitable for the determination of lidocaine in urine.

Keywords Lidocaine, liquid phase microextraction, high performance liquid chromatography

(Received 10 November 2003; accepted 19 April 2004)

关于召开“第九届全国电分析化学学术会议”的通知 (第一轮通知)

中国化学会、中国金属学会、中国仪器仪表学会联合主办、江苏省化学化工学会分析化学专业委员会协办的“第九届全国电分析化学学术会议”定于 2005 年 10 月 28 日 ~ 11 月 1 日在南京召开。本次大会由南京大学负责筹备,由汪尔康院士、陈洪渊院士任大会主席。会议邀请国内从事电分析化学研究的著名科学家及中青年学者参加,并在全国范围内征文,热忱欢迎踊跃投稿并到会交流。有关征文事宜通知如下:

一、会议主题

(1)电分析化学基础理论与发展综述;(2)生物电分析化学;(3)电化学传感器与电化学免疫分析;(4)化学修饰电极与微电极;(5)电位法、伏安法及其它电分析技术;(6)电分析化学联用技术;(7)界面电化学与光谱电化学;(8)纳米电分析化学;(9)电分析化学仪器的新发展及其应用;(10)其它。

二、征文内容

(1)凡与上述主题相关的分析新理论、新方法和新技术均为本次大会的征文范围。已在刊物上发表或全国会议上报告过的论文不在应征之列。(2)作者需提交电子版论文的详细摘要,用 WORD 软件编辑,其中包括题目、作者、单位、主要结果和讨论、主要参考文献和英文摘要。全文不超过 2 页(A4 纸、15 cm $\times$ 24 cm,含图表),题目请用三号黑体、全文用小四号字宋体或 Times New Roman 打印。论文务请提供稿件联系人电话、通讯地址和 Email 地址。

三、联系方式

(1)应征论文请发至 hxj@nju.edu.cn 电子信箱,均注明“会议征文”字样,截稿日期 2005 年 6 月 31 日。

(2)会议相关事宜请与大会秘书长鞠熷先教授联系,电话 025 - 83593593。

欢迎国内外分析仪器公司、厂商到会介绍和展出产品。

第九届全国电分析化学学术会议筹备组