

高效液相色谱法快速测定外用成人用品中 16种局麻成分

黄艳婷*, 庄 玥, 邱蕴绮

(广东省药品检验所, 国家药品监督管理局药品快速检验技术重点实验室, 广东 广州 510663)

摘要: 该文基于核壳填料色谱柱技术, 建立了同时快速测定外用成人用品中16种局麻成分(普鲁卡因、丁卡因、异丁香酚甲醚、盐酸氯普鲁卡因、盐酸利多卡因、苯佐卡因、甲磺酸罗哌卡因、硫酸丁丙卡因、普鲁卡因胺、丙胺卡因、丁吡卡因、盐酸奥布卡因、丁香酚、盐酸普莫卡因、地布卡因、丁香酚甲醚)的高效液相色谱分析方法。样品经含0.1%盐酸的甲醇超声提取, 采用Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(50 mm×4.6 mm×2.7 μm)分离, 以磷酸氢二钾溶液(pH 3.0)-甲醇-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 流速1.5 mL/min, 柱温35℃, 二极管阵列检测器检测, 检测波长为210 nm和280 nm, 外标法定量。结果显示: 16种局麻成分在一定质量浓度范围内线性良好, 相关系数不低于0.999 7。甲磺酸罗哌卡因的检出限(LOD, S/N=3)为3.1 μg/g, 定量下限(LOQ, S/N=10)为10.2 μg/g; 其余15种化合物的LOD均为1.0 μg/g, LOQ为3.3 μg/g; 16种局麻成分在低、中、高3个加标水平下的平均回收率为93.3%~103%, 相对标准偏差(RSD)为0.08%~1.2%。该方法快速、准确, 适用于外用成人用品中局麻成分的快速筛查, 具有广阔的应用前景。

关键词: 快速筛查; 高效液相色谱; 成人用品; 局麻成分

中图分类号: O657.71 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2020)12-1533-05

Rapid Determination of 16 Local Anesthetic Components in Adult Products by High Performance Liquid Chromatography

HUANG Yan-ting*, ZHUANG Yue, QIU Yun-qi

(NMPA Key Laboratory for Rapid Testing Technology of Drugs, Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510663, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography (HPLC) using fused-core silica particles column was developed for the rapid determination 16 local anesthetic components, including procaine, tetracaine, methyl isoeugenol, chlorprocaine hydrochloride, lidocaine hydrochloride, benzocaine, ropivacaine mesylate, butacaine sulphate, procainamide, prilocaine, bupivacaine, benoxinate hydrochloride, eugenol, pramoxine hydrochloride, cinchocaine and methyl eugenol. The samples were ultrasonically extracted with 0.1% hydrochloride-methanol, and separated on an Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(50 mm×4.6 mm×2.7 μm) at 35℃ by gradient elution, with dipotassium hydrogen phosphate solution (pH 3.0)-methanol-acetonitrile as mobile phase at a flow rate of 1.5 mL/min. The detection wavelengths for diode array detector were set at 210 nm and 280 nm. Quantification analysis was performed by the external standard method. Results indicated that the calibration curves for the 16 compounds showed good linearity in a certain range of mass concentration with their correlation coefficients not less than 0.999 7. The limits of detection (LOD, S/N=3) and limits of quantitation (LOQ, S/N=10) for ropivacaine mesylate were 3.1 μg/g and 10.2 μg/g, respectively. The LODs and LOQs for other 15 compounds were 1.0 μg/g and 3.3 μg/g, respectively. The average recoveries at three spiked levels ranged from 93.3% to 103%, with relative standard deviations (RSD) of 0.08% - 1.2%. The method was rapid and accurate, and could be used for the rapid screening of local anesthetic components in adult products, indicating its extensive application

收稿日期: 2020-05-08; 修回日期: 2020-07-14

基金项目: 2018年度广东省科技创新战略专项(2018B020207008)

*通讯作者: 黄艳婷, 主管药师, 研究方向: 健康产品原辅料检测, E-mail: 121308721@qq.com

prospect.

Key words: rapid screening; high performance liquid chromatography (HPLC); adult products; local anesthetic components

随着人们生活水平的提高和思想的开放,市面上出现成人用品的种类也日益繁多。口服壮阳产品中非法添加现象经过多年的稽查打假虽已得到抑制,但部分外用成人用品(润滑油、延时喷剂)等却得不到有效监管。一些不法商家利用消费者追求延长房事时间的心理,向外用产品中添加局麻药成分以牟取暴利^[1],但长期大量使用有可能引起各种不良反应,甚至可能引起癫痫、心律失常等严重后果,严重危及消费者或其伴侣健康。局麻药全称为局部麻醉药,是一类通过阻滞钠离子通道,可逆性地抑制神经冲动从而达到神经阻滞作用的药物,其根据中间链的不同,又可分为以普鲁卡因为代表的酯类局麻药,以利多卡因为代表的酰胺类局麻药,以及来源于桃金娘科植物丁香的有效活性成分丁香酚及其衍生物丁香酚类共 3 类局麻药。其中,酯类和酰胺类局麻药的检测方法有液相色谱法^[2-7]、液相色谱-质谱法^[8-9]、紫外分光光度法、毛细管电泳法等,丁香酚类有液相色谱法^[10]、液相色谱-质谱法^[11-12]、气相色谱法^[13]、气相色谱-质谱法^[14]等,但这些方法大都局限于检测一类局麻药,未见同时检测 3 类局麻药的分析方法。

随着液相色谱柱技术的不断发展,利用核壳色谱柱在普通液相色谱上能达到提高分离效率和分离速度的效果^[15-16],具有成本低、短时间内可同时测定多个不同类别成分含量等特点,更适合于基层快检室和移动实验室等在现场检测样品。基于此,本文采用核壳色谱柱建立了外用成人用品中 16 种局麻药的高效液相色谱快速检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 LC 20-AT 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器)。甲醇为色谱纯;磷酸、磷酸氢二钾和庚烷磺酸钠均为分析纯。16 种局麻药标准品:普鲁卡因(Procaine, CAS: 59-46-1)、丁卡因(Tetracaine, CAS: 94-24-6)购自 Aladdin 公司;异丁香酚甲醚(Methyl isoeugenol, CAS: 93-16-3)购自天津希恩思生化科技有限公司;盐酸氯普鲁卡因(Chlorprocaine hydrochloride, CAS: 3858-89-7)、盐酸利多卡因(Lidocaine hydrochloride, CAS: 73-78-9)、苯佐卡因(Benzocaine, CAS: 94-09-7)、甲磺酸罗哌卡因(Ropivacaine mesylate, CAS: 854056-07-8)购于中检院;硫酸丁丙卡因(Butacaine sulphate, CAS: 149-15-5)为 Toronto Research Chemicals 产品;普鲁卡因胺(Procainamide, CAS: 51-06-9)、丙胺卡因(Prilocaine, CAS: 721-50-6)、丁吡卡因(Bupivacaine, CAS: 2180-92-9)、盐酸奥布卡因(Benoxinate hydrochloride, CAS: 5987-82-6)、丁香酚(Eugenol, CAS: 97-53-0)、盐酸普莫卡因(Pramoxine hydrochloride, CAS: 637-58-1)、地布卡因(Cinchocaine, CAS: 85-79-0)为上海源叶生物有限公司产品;丁香酚甲醚(Methyl eugenol, CAS: 93-15-2)购自 Mackin 公司;标准品含量均大于 93.4%。

1.2 标准溶液配制

精密称取 16 种局麻药成分标准品各 10 mg,分别置于 10 mL 容量瓶中,用稀释液(含 0.1% 盐酸的甲醇溶液)配成质量浓度为 1 000 mg/L 的贮备液。定性鉴别时将各贮备液用稀释液稀释至 25 mg/L;定量分析时将阳性成分贮备液用稀释液稀释成 100、50、25、10、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列混合标准溶液。

1.3 样品前处理

精密称取 1 g(精确至 0.001 g)样品,置于 10 mL 具塞比色管中,加入稀释液(含 0.1% 盐酸的甲醇溶液)适量,超声处理 15 min,冷却至室温,再用稀释液稀释至刻度,摇匀,必要时离心。取上清液过 0.45 μm 滤膜,待测。若样品中待测成分的浓度超出线性范围,再用稀释液适当稀释处理。

1.4 色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm \times 4.6 mm \times 2.7 μm); 流动相: A 为磷酸氢二钾溶液(称取 2.28 g 磷酸氢二钾和 0.41 g 庚烷磺酸钠,用水稀释至 1 000 mL,用磷酸调至 pH 3.0); B 为甲醇-

乙腈(体积比1:1); 梯度洗脱程序: 0~8 min, 95%~14% A; 8~10 min, 14% A; 流速: 1.5 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL; 检测波长为210 nm(利多卡因、丙胺卡因、罗哌卡因、丁吡卡因和普莫卡因)和280 nm(其余成分)。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

实验考察了 Agilent Poroshell 120 EC - C₁₈ (50 mm × 4.6 mm × 2.7 μm)、Agilent Poroshell 120 EC - C₁₈ (100 mm × 4.6 mm × 2.7 μm)、Acchrom Alphasil VC - C₁₈ (100 mm × 3.0 mm × 2.5 μm) 和 Acchrom Alphasil VC - C₁₈ (100 mm × 4.6 mm × 2.5 μm) 4种亚3微米色谱柱对16种局麻药的分离情况。结果显示: 16种局麻药在上述4种不同类型色谱柱的保留能力不同, 通过优化调节流速和梯度比例等色谱条件后, Poroshell 50 mm 色谱柱中各成分能达到基线分离, Acchrom 色谱柱中普鲁卡因胺和丁卡因峰出现拖尾现象, 其余色谱柱分析时间较长且丁吡卡因与盐酸奥布卡因不能达到基线分离。因此, 选择 Poroshell C₁₈ 色谱柱(50 mm × 4.6 mm × 2.7 μm) 进行后续实验。

由于16种局麻药的DAD光谱不尽相同, 其中利多卡因等5种成分在200 nm以上无特征吸收峰, 均在210 nm处紫外吸收较强, 但210 nm处色谱基线波动较大。其余11种成分均在280 nm处有较强吸收, 色谱峰面积更适合定量分析, 且280 nm处色谱基线相对平稳。综合光谱及基线波动选择210 nm(利多卡因、丙胺卡因、罗哌卡因、丁吡卡因和普莫卡因)和280 nm(其余成分)作为检测波长。优化条件下的16种局麻药色谱图见图1。

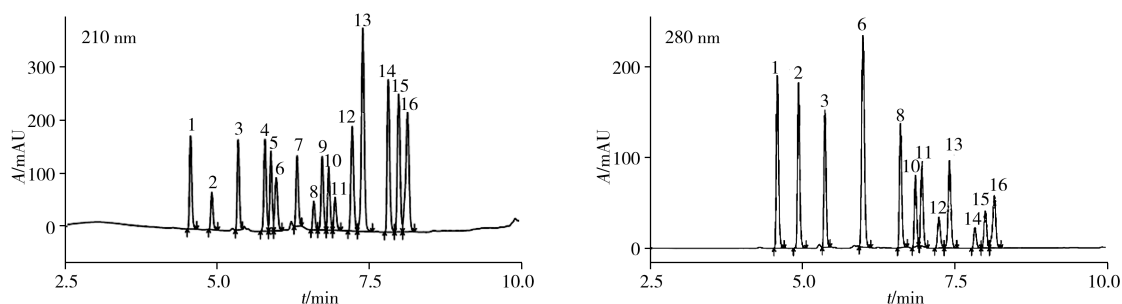


图1 16种成分标准溶液色谱图(25 μg/mL)

Fig. 1 Chromatograms of 16 compounds standard solution (25 μg/mL)
the peak number 1 - 16 as same as those in Table 1

2.2 流动相及稀释液的选择

由于16种局麻药结构差异较大, 以磷酸氢二钾为流动相时, 丁吡卡因与盐酸奥布卡因等色谱峰分离度较差, 普鲁卡因胺保留时间短而受基质干扰, 且普鲁卡因类成分可能存在离子化分叉现象。因此, 考虑向流动相中添加一定量庚烷磺酸钠以增加保留, 并用磷酸调节pH值(2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0)。结果发现, 在pH 3.0时各成分保留和分离效果最好。另外, 实验还考察了甲醇、乙腈、水及其酸化溶液为稀释液配制标准溶液的影响, 发现以甲醇(含0.1%盐酸)为稀释液时能显著抑制离子化现象, 此时普鲁卡因胺和氯普鲁卡因峰形最好, 所有成分的峰面积良好, 适合定量分析, 因此选择含1%盐酸的甲醇为稀释液。

2.3 样品提取

由于外用成人用品主要为润滑液(油)、男用喷剂、男用湿巾等, 样品基质较为简单, 实验通过考察甲醇、乙腈、水及其酸化溶液等^[17]提取试剂, 以及超声、离心等操作, 发现加入0.1%盐酸的甲醇溶液后经过简单超声即可完全提取目标成分, 同时满足本方法在设备简单的现场操作需求。

2.4 线性方程、检出限及定量下限

取16种局麻药的系列(质量浓度为100、50、25、10、5 μg/mL)混合标准溶液, 在优化条件下测定, 以各化合物的质量浓度为横坐标, 对应峰面积为纵坐标, 进行线性回归并绘制标准曲线, 外标法定量。以3倍信噪比($S/N=3$)计算方法检出限(LOD), 以 $S/N=10$ 计算定量下限(LOQ)。结果显示,

16 种局麻药在一定质量浓度范围内线性良好, 相关系数(r)均不低于 0.999 7; 其中, 甲磺酸罗哌卡因响应较小, LOD 为 3.1 $\mu\text{g/g}$, LOQ 为 10.2 $\mu\text{g/g}$; 其余 15 种局麻药的 LOD 均为 1.0 $\mu\text{g/g}$, LOQ 均为 3.3 $\mu\text{g/g}$ (表 1)。

表 1 16 种成分的线性范围、相关系数、回收率、检出限及定量下限

Table 1 Linear range, correlation equation(r), recovery, detection limit and quantitation limit of 16 compounds

| No. | Compound | Linear range ($\mu\text{g/mL}$) | r | Added ($\mu\text{g/g}$) | Recovery(%) | RSD(%) | LOD ($\mu\text{g/g}$) | LOQ ($\mu\text{g/g}$) |
|-----|------------------------------|--------------------------------------|---------|------------------------------|------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | Procainamide | 5.1~101.9 | 0.999 9 | 50, 100, 500 | 93.3, 95.4, 95.0 | 0.55, 0.59, 0.96 | 1.0 | 3.3 |
| 2 | Procaine | 5.1~103.0 | 0.999 9 | 50, 100, 500 | 100, 102, 102 | 0.88, 1.2, 1.2 | 1.0 | 3.3 |
| 3 | Chloroprocaine hydrochloride | 5.1~101.8 | 1.000 0 | 50, 100, 500 | 99.9, 98.9, 99.8 | 0.36, 0.46, 0.49 | 1.0 | 3.3 |
| 4 | Lidocaine hydrochloride | 5.3~105.4 | 1.000 0 | 50, 100, 500 | 98.9, 98.6, 98.2 | 0.26, 0.36, 0.20 | 1.0 | 3.3 |
| 5 | Prilocaine | 5.2~103.4 | 0.999 9 | 50, 100, 500 | 101, 101, 101 | 0.25, 0.40, 0.57 | 1.0 | 3.3 |
| 6 | Benzocaine | 5.2~104.0 | 0.999 7 | 50, 100, 500 | 99.9, 99.6, 99.2 | 1.2, 1.2, 1.2 | 1.0 | 3.3 |
| 7 | Ropivacaine mesylate | 5.2~104.9 | 0.999 7 | 50, 100, 500 | 98.3, 99.4, 98.8 | 0.65, 0.30, 0.59 | 3.1 | 10.2 |
| 8 | Butacaine sulphate | 5.2~104.0 | 1.000 0 | 50, 100, 500 | 98.5, 97.8, 98.5 | 0.66, 0.59, 0.50 | 1.0 | 3.3 |
| 9 | Bupivacaine | 5.1~101.5 | 0.999 9 | 50, 100, 500 | 99.2, 99.8, 98.2 | 0.29, 0.28, 0.60 | 1.0 | 3.3 |
| 10 | Benoxinate hydrochloride | 4.9~98.8 | 1.000 0 | 50, 100, 500 | 98.8, 99.6, 98.2 | 0.79, 0.60, 1.2 | 1.0 | 3.3 |
| 11 | Tetracaine | 5.2~103.1 | 0.999 9 | 50, 100, 500 | 102, 102, 103 | 0.09, 0.08, 0.26 | 1.0 | 3.3 |
| 12 | Eugenol | 5.3~105.3 | 1.000 0 | 50, 100, 500 | 101, 102, 100 | 0.19, 0.49, 0.78 | 1.0 | 3.3 |
| 13 | Pramoxine hydrochloride | 5.1~101.1 | 1.000 0 | 50, 100, 500 | 99.9, 99.9, 99.6 | 0.08, 0.09, 0.30 | 1.0 | 3.3 |
| 14 | Cinchocaine | 4.9~98.4 | 0.999 9 | 50, 100, 500 | 97.6, 97.7, 97.8 | 0.97, 0.99, 0.98 | 1.0 | 3.3 |
| 15 | Methyl eugenol | 5.4~108.7 | 1.000 0 | 50, 100, 500 | 99.0, 98.7, 99.3 | 0.38, 0.77, 0.30 | 1.0 | 3.3 |
| 16 | Methyl iso Eugenol | 5.2~104.6 | 0.999 9 | 50, 100, 500 | 102, 102, 102 | 0.80, 0.79, 0.70 | 1.0 | 3.3 |

2.5 回收率、精密度与稳定性

取一个阴性样品(延时喷剂), 分别向其中添加 50、100、500 $\mu\text{g/g}$ 3 个浓度水平的 16 种局麻药, 在优化条件下处理并测定, 每个浓度水平平行实验 6 次, 计算各化合物的平均回收率和相对标准偏差(RSD)。结果表明, 16 种局麻药的平均回收率为 93.3%~103%, RSD($n=6$)为 0.08%~1.2%, 满足非法添加化学成分检测的技术要求。

另取一份 500 $\mu\text{g/g}$ 回收溶液重复进样 6 次, 结果 16 种局麻药峰面积的 RSD 均不大于 1.2%, 保留时间的 RSD 均不大于 0.40% (相差不大于 0.05 min), 表明方法重复性良好。将上述溶液室温下放置 2、4、8、12、24 h 后进样测定, 计算得各成分峰面积的 RSD 均不大于 1.4%, 保留时间的 RSD 均不大于 0.40% (相差不大于 0.06 min), 表明各成分在 24 h 内稳定。

2.6 实际样品测定

从某网上商城收集 44 批样品, 在优化条件下测定, 结果显示: 久本时光宝盒男士喷剂、印度神油加强版男用喷剂、LDILD 男士喷剂和强狮男用抑菌喷剂检出丁卡因(含量为 0.2~14.9 mg/g); 微爱男士抑菌喷剂和印度神油(女士试用装)检出丁香酚(含量分别为 18.4 mg/g 和 1.9 mg/g); 杜伊特 358 倍液(第三代)、Ivirgo 男士外用喷剂和 H0T 喷剂检出利多卡因(按盐酸利多卡因计含量为 2.5~14.5 mg/g); 印度神油(男士试用装)检出利多卡因和丁香酚, 按盐酸利多卡因计含量为 1.7 mg/g , 丁香酚含量为 7.1 mg/g 。阳性样品 10 批, 检出率 22.7%。当检出阳性样品时, 可采用加标回收验证, 或采用液相色谱-质谱等方法确证。

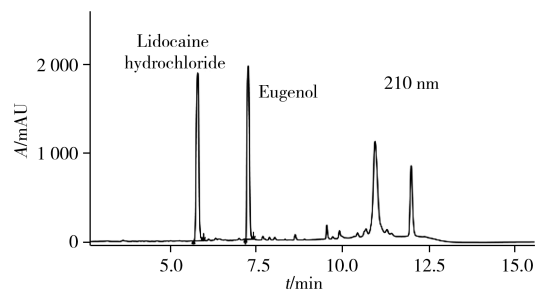


图 2 代表性样品谱图(210 nm)

Fig. 2 Chromatogram(210 nm) of representative sample

3 结论

本研究以稽查关注较少的外用成人用品为研究对象, 建立了同时测定 16 种非法添加局麻成分的液相色谱快速检测方法。结果显示, 16 种局麻药成分在一定质量浓度范围内呈良好的线性关系, 相关系

数均不低于0.9997, 甲磺酸罗哌卡因的检出限为 $3.1\ \mu\text{g/g}$, 定量下限为 $10.2\ \mu\text{g/g}$, 其余化合物的LOD均为 $1.0\ \mu\text{g/g}$, LOQ为 $3.3\ \mu\text{g/g}$; 用其检测市售44批外用成人用品, 阳性检出率达22.7%, 均为延时喷剂和润滑液, 且大部分标识为纯天然、纯中药产品, 存在严重的安全隐患。本方法操作简单、准确性高、分析时间短, 可为此类产品现场监督提供技术支持, 具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Zou Y H, Liu Y W, Zheng J. *Chin. J. Mod. Appl. Pharm.* (邹耀华, 刘宇文, 郑娟. 中国现代应用药学), **2017**, 34(9): 1282–1285.
- [2] Cheng H, Li Y, Xing J L, Zhang S F, Zheng R X, Ying L, Cao L L, Mao L Y. *J. Food Saf. & Qual.* (承海, 李杨, 邢家深, 张书芬, 郑睿行, 应璐, 曹丽丽, 毛玲燕. 食品安全质量检测学报), **2020**, 11(2): 449–454.
- [3] China Food and Drug Administration. *Safety and Technological Standards for Cosmetic*. 2015 Ed. (国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范. 2015年版), **2015**.
- [4] Wang Q, Tao M, Peng L, Zhou H H, Mei X G, Xiao R L. *Guangdong Chem. Ind.* (王琦, 陶敏, 彭龙, 周惠惠, 梅兴国, 肖若蕾. 广东化工), **2019**, 46(22): 122–124.
- [5] Xuan K Z, Chen Y W, Ji S F. *Acta Agric. Univ. Jiangxiensis* (禰开智, 陈艺玮, 纪少凡. 江西农业大学学报), **2018**, 40(4): 843–849.
- [6] Zhou Y R, Zha J M, Jing Z X, Shao Q, Wen B. *Chin. J. Pharm. Anal.* (周雅茹, 查佳明, 荆志欣, 邵奇, 文彬. 药物分析杂志), **2018**, 38(3): 469–476.
- [7] Couto R O, Cubayachi C, Lopez R F V, Gaitani C M D, Pedrazzi V, Freitas O D. *Biomed. Chromatogr.*, **2016**, 30(6): 857–866.
- [8] Abbas M, Ahmad L, Shah Y, Gill M, Watson D G. *Talanta*, **2013**, 117: 60–63.
- [9] Lian X H, Wang C, Meng X S, Bai H, Sun X J, Xue H Y, Ma Q. *Chin. J. Anal. Chem.* (连显会, 王春, 孟宪双, 白桦, 孙小杰, 薛宏宇, 马强. 分析化学), **2019**, 47(5): 756–764.
- [10] Gao P, Huang H, Liu W X, Huang G F, Li Z Q, Yang J L, Chen H. *Chin. J. Food Hyg.* (高平, 黄和, 刘文侠, 黄国方, 李志清, 杨嘉丽, 陈焕. 中国食品卫生杂志), **2016**, 28(1): 56–61.
- [11] Liu P, Xin S Y, Fan S, Wang L L, Luo R C, Wu G H, Zhao R, Zhao Y. *J. Hyg. Res.* (刘平, 辛爽英, 范赛, 王莉莉, 罗仁才, 吴国华, 赵榕, 赵耀. 卫生研究), **2019**, 48(4): 640–645, 650.
- [12] Ni Z F, Gu Y, Feng Y W, Xue Q H, Wang Q. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.* (倪峥飞, 顾晔, 冯永巍, 薛庆海, 王琴. 质谱学报), **2018**, 39(4): 451–458.
- [13] Chen H, Huang H, Gao P, Yang J L, Huang G F, Liu W X. *Sci. Technol. Food Ind.* (陈焕, 黄和, 高平, 杨嘉丽, 黄国方, 刘文侠. 食品工业科技), **2015**, 36(8): 88–92, 102.
- [14] Chen H, Huang H, Gao P, Cao Z H, Sun L J, Ji H W. *The Food Ind.* (陈焕, 黄和, 高平, 曹湛慧, 孙力军, 吉宏武. 食品工业), **2017**, 38(7): 305–309.
- [15] He R S, Huang Y T, Lei Y, Wang D M. *J. Instrum. Anal.* (何睿偲, 黄艳婷, 雷毅, 王冬梅. 分析测试学报), **2016**, 35(11): 1486–1490.
- [16] Lei Y, Huang Y T, Chen L, Zhang R. *Phys. Test. Chem. Anal. : Chem. Anal.* (雷毅, 黄艳婷, 陈林, 张荣. 理化检验—化学分册), **2016**, 52(3): 249–254.
- [17] Zhang Y S, Lin Z H, Hu Y L, Li G K. *J. Instrum. Anal.* (张艳树, 林振华, 胡玉玲, 李攻科. 分析测试学报), **2016**, 35(2): 127–136.

(责任编辑: 周启动)