

## 高效毛细管电泳法测定利多卡因代谢产物单乙基甘氨酸二甲苯胺\*

崔贞福 贺 平 吴孟超 李琳芳 郭亚军(上海 200438 第二军医大学东方肝胆外科研究所肿瘤免疫基因治疗中心)

**摘要** 目的:建立一种测定利多卡因代谢产物单乙基甘氨酸二甲苯胺(MEGX)含量的高效毛细管电泳法。方法:用50 mmol/L 硼酸缓冲液(pH=8.8)为电泳电解液,电压12 kV,运行电流18.8~23.2  $\mu$ A,检测波长214 nm,有效毛细管长度50 cm,管径50  $\mu$ m,氨茶碱为内标,展开12 min。8只昆明种小白鼠腹腔注射0.2%利多卡因40 mg/kg,用本法测定其5 h尿液中MEGX累积排泄量。结果:MEGX迁移时间7.8 min,氨茶碱迁移时间10.7 min。MEGX含量为0.062~1.0 mg/ml时,其浓度与色谱峰面积线性关系良好, $r=0.9991$ ,日内、日间变异系数均小于7.8%,回收率为98.4%~101.6%,常用30种药物对其无干扰。8只小鼠MEGX累积排泄量为 $(295.2 \pm 55.2) \mu\text{g}$ ,其中游离型MEGX为44.7%,结合型为55.3%。结论:该方法简单、快速、灵敏、特异性和重现性良好,具有较强实用价值。

**关键词** 高效毛细管电泳;单乙基甘氨酸二甲苯胺;利多卡因

### Determination of monoethylglycinexylidide, a metabolite of lidocaine, with high performance capillary electrophoresis

Cui Zhenfu( Cui ZF ), He Ping( He P ), Wu Mengchao( Wu MC ), et al( Tumor Immunology and Gene Therapy Center, Eastern Institute of Hepatobiliary Surgery, Second Military Medical University, Shanghai 200438 )

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To develop a method for the determination of monoethylglycinexylidide ( MEGX ), a metabolite of lidocaine by high performance capillary electrophoresis. **METHODS:** 50 mmol/L borate buffer, pH 8.8, was used as the electrophoresis solution. Electrophoresis was carried out with a constant voltage of 15 kV and a current of 18.8 ~ 23.2  $\mu$ A and aminophylline as internal standard. The length of effective capillary was 50 cm ( DI 50  $\mu$ m ). The detecting wavelength was 214 nm, 8 mice were administered 0.2 % lidocaine 40 mg/kg, ip. The content of MEGX in the urine collected for 5 h was measured. **RESULTS:** The migration time of MEGX was 7.8 min and that of aminophylline was 10.7 min. The linear range was 62 ~ 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $r=0.9991$ ) with relative standard deviations less than 7.8 %. The total content of MEGX in the urine collected for 5 h in mice was  $(295.2 \pm 55.2) \mu\text{g}$ , among which free MEGX was 44.7 % and conjugated MEGX was 55.3 %. **CONCLUSION:** The method was fast, convenient and sensitive. It was applied to assay MEGX in mouse urine and got satisfactory results.

**KEY WORDS** high performance capillary electrophoresis, MEGX, lidocaine

单乙基甘氨酸二甲苯胺(MEGX)是利多卡因的代谢产物。在体内,利多卡因经肝P-450 3A酶代谢,氧位去乙基,生成MEGX。其一部分以游离形式直接从尿液中排出体外,另一部分在肝脏中进行II相代谢反应,与硫酸或葡萄糖醛酸结合后,经尿液排出体外<sup>[1]</sup>。近年来,大量研究表明,MEGX的生成速率及含量变化与肝脏贮备功能密切相关。所以,MEGX试验(MEGX test)

目前被广泛用于临床和药理学实验,评估肝移植时供肝的贮备功能,以及各种因素对肝脏生物转化功能的影响<sup>[2,3]</sup>。测定MEGX含量的方法有多种,通常采用荧光偏振免疫法和高效液相色谱法。但是,这2种方法不仅价格昂贵,前者还受多种干扰因素影响,有时实验

\*军队九五攻关课题基金资助第98D042号

误差较大。后者需要复杂的样品预处理,不能满足实时分析的要求。高效毛细管电泳技术是近 10 年迅速发展起来的一种新型分离分析方法,具有快速、简便、高效、应用范围广泛等优点<sup>[4]</sup>。本文采用硼酸缓冲液为电解液,氨茶碱为内标,建立了一种测定 MEGX 含量的高效毛细管电泳法。

## 1 实验材料

**1.1 仪器与试剂** Beckman 高效毛细管电泳系统 (P/ACE 5000 型主机,IBM 446DXZ 型电脑,Epson LQ-300 型打印机,GOLD 软件);石英毛细管  $57\text{cm} \times 50\mu\text{m}$  (美国 Beckman 公司),有效长度  $50\text{cm}$ 。MEGX(第二军医大学药学院李克教授提供)。氨茶碱(上海信谊药厂,批号:951003)。 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶/硫酸酶(Sigma 公司)。硼砂、硼酸、氢氧化钠、盐酸等试剂均为国产分析纯或优级纯,水为自制双蒸去离子水。

**1.2 实验动物** 昆明种小白鼠,雄性,18~22g(中科院上海实验动物中心,清洁级,证书号 005)。所有小鼠 8:00am~8:00pm 照光,8:00pm~8:00am 避光,10:00am~3:00pm 喂食,自由饮水,实验前 12h 开始禁食。

## 2 方法与结果

**2.1 测定条件** 每次开机后用  $0.1\text{mol/L}$  盐酸,  $0.1\text{mol/L}$  氢氧化钠,  $50\text{mmol/L}$  硼酸缓冲液( $\text{pH}=8.8$ )和水各冲洗 5min,2 次进样之间用电泳缓冲液和水各冲洗 2min。高压进样 10s,恒定电压  $12\text{kV}$ ,运行电流  $18.8 \sim 23.3\mu\text{A}$ ,柱温  $21^\circ\text{C}$ ,检测波长  $214\text{nm}$ ,设定运行时间 12min,氨茶碱为内标。用 Beckman 黄金系统软件分析处理所得资料。在此条件下,MEGX 迁移时间为 7.8min,氨茶碱迁移时间为 10.7min。

**2.2 样品处理** 取含 MEGX 的小鼠尿液  $0.2\text{ml}$ ,加  $0.1\text{mol/L}$  醋酸钠缓冲液( $\text{pH}5.5$ )  $0.2\text{ml}$  及  $0.5\%$  氨茶碱  $20\mu\text{l}$ ,混匀。加甲醇  $0.4\text{ml}$ ,旋涡震荡 1min,10000r/min 离心 15min,取上清,按《测定条件》分析测定。用空白小鼠尿液同法操作,发现对样品测定无干扰,结果见图 1。

**2.3 标准曲线** 将 MEGX 配制成 62.5,125,250,500 和  $1000\mu\text{g/ml}$  的标准液,分别取  $0.2\text{ml}$ ,按“样品处理”项下操作,每个浓度均为 3 复管。将 MEGX 与氨茶碱峰面积比对 MEGX 浓度进行线性回归,其理论方程为:  $Y=379.79x+6.87$ ,  $r=0.9991$ 。当信噪比为 2:1 时,最低检测限为  $2.5\mu\text{g/ml}$ 。

**2.4 干扰试验** 在本试验条件下,测定了临床上常用的 30 种药物:利血平、肝太乐、氨甲苯酸、谷氨酸钠、葡萄糖酸钙、精氨酸、氯化可的松、5-Fu、维生素 C、肌苷、甲氧氯普胺、地塞米松、氯丙嗪、麻黄碱、维生素  $B_6$ 、辅

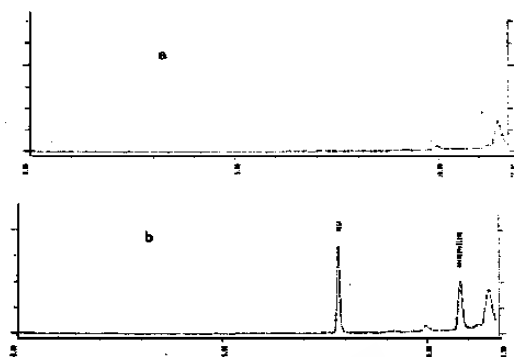


图 1 MEGX 的高效毛细管电泳图

a - 空白小鼠尿液;b - 小鼠尿液中 MEGX 的色谱图

酶 A、ATP、酚磺乙胺、呋塞米、阿托品、川芎、丹参、维生素  $B_{12}$ 、维生素  $K_3$ 、维生素  $K_1$ 、庆大霉素、氨苄青霉素、链霉素、卡那霉素、氯霉素,结果表明,它们对 MEGX 及内标氨茶碱的色谱峰均无干扰。

**2.5 回收率及精密度** 用空白小鼠尿液加 MEGX 配制成表 1 所示的 3 种不同浓度,按“样品处理”项下操作,计算回收率及日内、日间精密度,结果见表 1。

表 1 MEGX 回收率和精密度/ $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$

| 样品 | 加入量<br>$/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ | 测得量<br>$/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ | 回收率<br>$/\%$    | 日内<br>RSD/ $\%$ | 日间<br>RSD/ $\%$ |
|----|--------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1  | 62.5                                       | $61.5 \pm 3.0$                             | $98.4 \pm 4.8$  | 5.3             | 7.8             |
| 2  | 250                                        | $254.0 \pm 9.8$                            | $101.6 \pm 3.8$ | 4.6             | 5.7             |
| 3  | 1000                                       | $1012.1 \pm 35.3$                          | $101.2 \pm 3.4$ | 4.1             | 5.3             |

**2.6 高效毛细管电泳法测定小鼠尿液中 MEGX 含量** 8 只小鼠,适应 1 周后,腹腔注射  $0.2\%$  利多卡因  $40\text{mg/kg}$ ,分别置于代谢笼中,收集 5h 尿液。测定体积后,各取  $0.2\text{ml} \times 2$ 。一份按“样品处理”项下操作,测定游离 MEGX 含量,另一份加  $2100\mu\text{l}$   $\beta$ -葡萄糖醛酸酶/硫酸酶  $0.2\text{ml}$ ,  $37^\circ\text{C}$  恒温孵育 20h 后,加甲醇  $0.4\text{ml}$ ,10000r/min 离心 15min,测定结合型与游离型 MEGX 总量。结合型 MEGX 含量 = (MEGX 总量 - 游离型 MEGX 含量)  $\times$  尿量。结果见表 2。

## 3 讨论

本文采用自由溶液电泳,以氨茶碱为内标,使被测样品获得良好分离效果。MEGX 及内标出峰快,迁移时间短于 11min。尤其是用甲醇沉淀尿液中蛋白质后,直接用上清液进样分析,避免了 HPLC 法的复杂处理过程,具有较强的实用价值。最低检测限为  $2.5\mu\text{g/ml}$ ,临床常用的 30 种药物对其色谱峰无干扰,回收率,日内、日间 RSD 均在允许范围之内,说明该方法简单、快速、灵敏、稳定,专一性强。给小鼠腹腔注射  $0.2\%$  利多卡因  $40\text{mg/kg}$  后,其 5h 尿液中 MEGX 累积排泄量为

表 2 小鼠尿液中结合型及游离型 MEGX 累积排泄量/  
μg

| 编号              | 结合型 MEGX<br>含量 | 游离型 MEGX<br>含量 | MEGX 累积<br>排泄量 |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1               | 142.7          | 155.2          | 297.9          |
| 2               | 140.4          | 217.0          | 357.4          |
| 3               | 138.3          | 220.2          | 358.5          |
| 4               | 161.9          | 167.2          | 329.1          |
| 5               | 146.4          | 165.9          | 312.3          |
| 6               | 110.2          | 145.1          | 255.3          |
| 7               | 96.1           | 110.3          | 206.4          |
| 8               | 121.6          | 123.1          | 244.7          |
| $\bar{x} \pm s$ | 132.2 ± 21.3   | 163.0 ± 39.5   | 295.2 ± 55.2   |

(295.2 ± 55.2) μg, 其中游离型 MEGX 占 44.7 %, 结合

型占 55.3 %, 该结果与人体实验资料基本是一致的。

## 参考文献

- 1 Tam YK, Ke J, Coutts TR, *et al*. Quantification of three lidocaine metabolites and their conjugates. *Pharm Res*, 1990, 7 (5): 504.
- 2 陈世耀, 王吉耀. 利多卡因试验在肝移植中的应用及其在慢性肝病诊断及预后评价中的应用前景. *临床肝胆病杂志*, 1996, 12(3): 128.
- 3 Von SJ, Erhard J, Beste M, *et al*. Conventional and quantitative liver function tests after hepatic transplantation prospective long-term follow-up. *Transpl Int*, 1997, 10(3): 212.
- 4 王杰, 丁洁. 高效毛细管电泳技术. *中国医药工业杂志*, 1997, 28(7): 327.

收稿日期: 1999 - 04 - 01