

盐酸丁卡因与赤藓红的荧光猝灭反应及其分析应用

秦明友, 刘绍璞, 刘忠芳, 胡小莉*

西南大学化学化工学院, 重庆 400715

摘要 在 pH 4.0 的弱酸性介质中, 盐酸丁卡因(TA# HCl) 与赤藓红(ET) 形成 1B1 的离子缔合物, 导致赤藓红溶液荧光猝灭。当分别于最大激发/ 最大发射(K_{ex}/K_{em}) 525 nm/556 nm 进行测量时, 荧光猝灭值(S_F) 与 TA# HCl 浓度在 0.128~41.8 Lg# mL⁻¹ 范围呈良好的线性关系。该方法灵敏度高, 检出限为 0.083 Lg# mL⁻¹。考察了共存物质的影响, 表明方法有良好的选择性。据此发展了一种高灵敏、简便快速测定微量 TA# HCl 的新荧光分光光度法。该法用于人血清及尿样中盐酸丁卡因的含量测定, 结果满意。文章还研究了反应体系的荧光特性, 并结合量子化学 AM1 计算对荧光猝灭机理进行了讨论。

关键词 盐酸丁卡因; 赤藓红; 荧光猝灭

中图分类号: O657.3 文献标识码: A

文章编号: 1000-0593(2008)0220382-05

引言

盐酸丁卡因是临床常用的对氨基苯甲酸酯类局部麻醉药, 化学名为 4-(丁氨基)2-苯甲酸2-(二甲氨基)乙酯盐酸盐。它具有粘膜穿透力强、无痛、无损伤、作用时间久、起效快等特点, 其药效强度为同类药物普鲁卡因的 10 倍, 毒性也比普鲁卡因高 10 倍, 毒性反应发生率也比普鲁卡因高, 使用不当可导致心脏传导系统和中枢神经系统出现抑制。因此, 发展和建立快速、简便、高灵敏度、高选择性的检测丁卡因血药浓度的方法是临床医学中一项十分重要的工作。目前测定盐酸丁卡因等对氨基苯甲酸酯类局部麻醉药的主要方法有紫外分光光度法^[1]、化学发光法^[2]、磷光光度法^[3]、间接原子吸收光度法^[4]、高效液相色谱法^[5, 6]、气相色谱法^[7]、顺序注射法^[9]、荧光分析法^[10]等。中国药典采用滴定法^[11]测定 TA# HCl 的含量, 该法需要将样品加热回流处理, 操作繁琐费时, 终点不易掌握, 灵敏度较低, 仅适用于药物中高含量 TA# HCl 的测定。报道较多的紫外分光光度法易受酯水解产物(对氨基苯甲酸)的干扰^[12], 故而准确度不够高。荧光分析法因选择性好、灵敏度高和操作简单、快速等特点而广泛应用于药物分析领域。但迄今荧光法测定盐酸丁卡因的报道^[13, 14]很少, 白林等根据 TA# HCl 自身具有微弱荧光的特点, 在 K_{ex}/K_{em} = 311 nm/370 nm 处用荧光光度法直接测定 TA# HCl 制剂含量^[14]。Nevado 等采用导数可变角同步荧光法测定可卡因样品中的丁卡因浓度, 但需要 90% 的乙醇和

8.0 @ 10⁻³ mol# L⁻¹ 的 NaOH 溶液作反应介质^[13]。

赤藓红, 又名四碘荧光素, 属于酸性咕吨类卤代荧光染料。在弱酸性介质中, 由于它的羟基氢原子发生离解而以负一价阴离子状态存在, 丁卡因则质子化为正一价阳离子形式, 二者借静电引力和疏水作用力可形成离子缔合物, 使赤藓红在 K_{ex}/K_{em} = 525 nm/556 nm 处产生荧光猝灭, TA# HCl 浓度在 0.128~41.8 Lg# mL⁻¹ 范围内与荧光猝灭程度有良好的线性关系, 由此建立了测定 TA# HCl 的荧光分析新方法, 适用于人血清及尿样中 TA# HCl 的含量测定。文中确定了离子缔合物的组成, 探讨了离子缔合物的结构, 并用量子化学 AM1 法计算了反应前后的电荷分布, 说明了电荷转移作用对于形成稳定的离子缔合物也是十分重要的。此外还讨论了荧光猝灭机理, 表明丁卡因对赤藓红溶液的荧光猝灭是一种静态猝灭。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

日立 F2500 荧光分光光度计(日立公司), PHS23C 型精密 pH 计(中国上海精密科学仪器有限公司)。

盐酸丁卡因(tetracaine hydrochloride, 缩写为 TA# HCl, 浙江九旭药业有限公司)溶液: 称取一定量配成 300.0 Lg# mL⁻¹ 的储备液; 然后稀释成 3.0 Lg# mL⁻¹ 的工作液。

赤藓红(erythrosin, 缩写为 ET, El Merck 公司): 配成 2.0 @ 10⁻⁴ mol# L⁻¹ 的工作液。

收稿日期: 20061029, 修订日期: 20070222

基金项目: 国家自然科学基金项目(20475045)和重庆市科委自然科学基金计划项目资助

作者简介: 秦明友, 1975 年生, 西南大学化学化工学院硕士研究生

E-mail: xiaoliu@swu.edu.cn

* 通讯联系人

BR 缓冲液: $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{PO}_4$, H_3BO_3 和 HAc 与 $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ 溶液按一定比例混合, 配成不同 pH 值的缓冲溶液, 并用酸度计进行标定。

以上试剂都是分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

依次将 11.00 mL BR 缓冲溶液, 2.00 mL 赤藓红溶液和一定量的 $301.0 \text{ Lg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 盐酸丁卡因溶液加入 10 mL 比色管中。用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 10 min 后, 于 $K_{\text{ex}}/K_{\text{em}} = 525 \text{ nm}/556 \text{ nm}$ 处, 测量试剂空白荧光强度 F_0 及离子缔合物的荧光强度 F , $F = F_0 - F_0$ 。

2 结果与讨论

2.1 光谱特征

盐酸丁卡因有微弱荧光, 其最大激发波长(K_{ex})和最大发射波长(K_{em})分别位于 311 nm 和 370 nm , 可用荧光法直接测定 TA#HCl, 但灵敏度较低^[14]。而赤藓红本身具有较强的荧光, $K_{\text{ex}}/K_{\text{em}}$ 为 $515 \text{ nm}/556 \text{ nm}$, 赤藓红与盐酸丁卡因形成离子缔合物后, 引起赤藓红的荧光猝灭, 且 K_{em} (556 nm) 保持不变, 而 K_{ex} 红移至 525 nm 处, ($K_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$, 见图 1。图 2 显示了 TA#HCl 与 ET 结合形成离子缔合物后, 体系的荧光猝灭程度在一定范围内与 TA#HCl 浓度呈线性关系, 表明可用荧光猝灭法测定 TA#HCl 的含量。

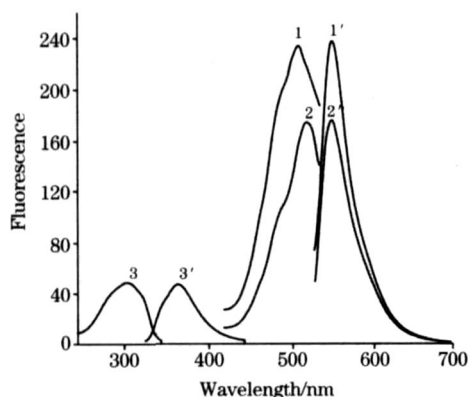


Fig 1 Fluorescence excitation and emission spectra of ET, TA#HCl and TA#HCl:ET

- 1, 1, ET: $K_{\text{ex}}/K_{\text{em}} = 515 \text{ nm}/556 \text{ nm}$;
- 2, 2, TA#HCl:ET: $K_{\text{ex}}/K_{\text{em}} = 525 \text{ nm}/556 \text{ nm}$;
- 3, 3, TA#HCl: $K_{\text{ex}}/K_{\text{em}} = 311 \text{ nm}/370 \text{ nm}$;

$c_{\text{TA#HCl}} = 2.4 \text{ Lg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $c_{\text{ET}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4.0

2.2 溶液酸度的影响

试验了溶液酸度对离子缔合物的形成和荧光强度的影响。实验表明 pH 3.9~4.3 时体系的荧光猝灭值最大 (见图 3), 实验选用 pH 4.0 的 BR 缓冲溶液, 用量以 11.00 mL 为宜。

2.3 显色时间和缔合物的稳定性

室温下, 该体系的反应 5 min 内完成, 其荧光猝灭值可稳定 4 h , 本实验选择在 10 min 后进行测定。

2.4 反应机理

2.4.1 离子缔合反应

用摩尔比法和等摩尔连续变化法分别测定了离子缔合物的组成比, 结果表明盐酸丁卡因与赤藓红形成 $1:1$ 的电中性离子缔合复合物, 该复合物的形成增大了 TA#HCl 酯基周围的空间位阻, 使酯键不易水解而较为稳定^[15]。由于 ET^- 和 HTA^+ 是带相反电荷的有机离子, 它们之间有较强的静电引力。此外 ET 的羧苯基和氧杂蒽酮具有疏水性, 而 TA 除质子化亚氨基之外的苯甲酸乙酯母体可视作疏水基团, 因此也有较强的疏水性, 两者借静电引力和疏水作用力彼此接近至一定距离即可形成较稳定的离子缔合物。

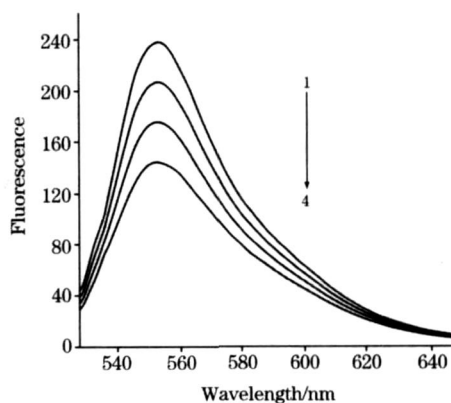


Fig 2 Fluorescence spectra of ET in the presence of different concentration TA#HCl

$c_{\text{TA#HCl}} (\text{Lg} \cdot \text{mL}^{-1})$: 1: 0; 2: 1.2; 3: 2.4; 4: 3.6;
 $c_{\text{ET}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4.0

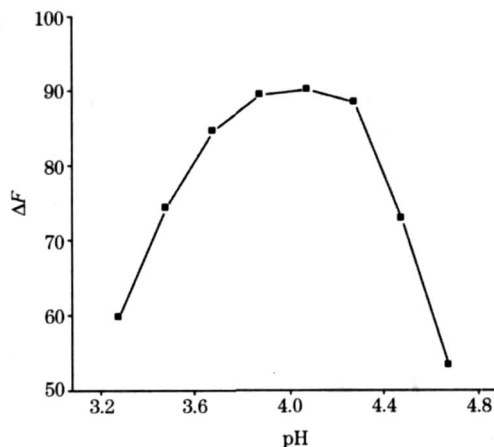
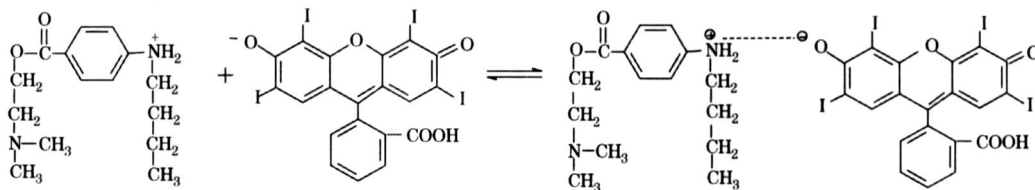


Fig 3 Effect of pH

$c_{\text{ET}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{TA#HCl}} = 3.6 \text{ Lg} \cdot \text{mL}^{-1}$

在 pH 4.0 左右的弱酸性介质中, 赤藓红主要以负一价阴离子存在。从结构上看, 它虽然可能有羟基离解和羧基离解的两种互变异构型体, 但此时主要应为羟基离解而羧基保持不变。因为在咕吨基上的羟基附近有较强的卤素吸电子基团, 使羟基氧的电子密度降低, 从而它比苯基上的羧基更易离解^[16]。在相似条件下, 如用羧基被乙基酯化的乙基曙红代替赤藓红, 发现仍可与 TA#HCl 反应, 也说明此时主要是羟基离解。量子化学 AM1 法计算结果也表明, 咕吨基上的

羟基和苯基上的) COOH 离解时体系的焓变分别为 -285.8 和 $-1651.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 前者比后者多放出 $1201.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 热量, 同样也说明按羟基离解方式体系更稳定。此外, AM1 计算显示 TA#HCl 分子中的 2 个 N 原子的电荷分布并不均匀, 与苯环直接相连的仲 N 原子和与酯基相连的叔 N 原子



由于质子化的 HTA⁺ 阳离子中带正电荷的 N 原子直接作用于赤藓红分子结构中位于大共轭体系中带负电荷的羟基 O 原子, 引起赤藓红 P 电荷分布和能量的变化, 因此导致荧光光谱的变化。这里用量子化学 AM1 法计算了反应前后 ET⁻ 和 HTA⁺ 之间的电荷分布的变化, 结果表明 ET⁻ 的总电荷从反应前的 -11.00 变化为反应后的 -11.64 , 而质子化的 HTA⁺ 从反应前的 11.00 降至反应后的 11.64 , 说明反应的结果发生了电荷转移作用。从光谱实验也可说明这种电荷转移作用的发生, 实验表明单独的 TA#HCl 无色, 仅在紫外区 310 nm 附近有吸收带; 而 ET 的最大吸收位于 526 nm , 当形成离子缔合物后, K_{max} 红移至 542 nm (见图 4)。在染料共轭体系中 P 电子云分布发生变化, 导致激发能 E 降低, 吸收带红移, 因此离子缔合物的形成除静电引力和疏水作用力外, 电荷转移作用的贡献也是不能忽视的。

赤藓红与盐酸丁卡因形成 1B1 的基态配合物时, 也应符合关系式 $F/F_0 = K[Q]$, K 表示离子缔合物的结合常数^[17], 由此计算出赤藓红与盐酸丁卡因缔合物反应常数 K 为 $4.5 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

2.1.4.2 荧光猝灭反应类型

荧光猝灭包括动态猝灭和静态猝灭^[18]。动态猝灭是指猝灭剂与荧光物质的激发态分子之间所发生的与扩散有关的相互作用过程, 如能量转移或电子转移过程。静态猝灭是猝灭剂和荧光物质分子在基态时生成不发光的配合物, 从而导致荧光强度降低的过程。二者的显著区别是: (1) 基态配合物的生成往往将引起荧光物质吸收光谱的改变。相反, 动态猝灭只影响荧光分子的激发态, 并不改变荧光物质的吸收光谱; (2) 温度升高可降低基态配合物的稳定性, 因而减小静态猝灭的程度。而动态猝灭与扩散有关, 温度升高将增大扩散系数, 从而增大双分子猝灭常数。以下从吸收光谱和温度效应两方面来探讨猝灭机理。

图 4 显示了赤藓红本身的最大吸收光谱 K_{max} 位于 526 nm , 而二者反应后吸收光谱发生明显变化, 不仅吸光度值显著降低, 而且 K_{max} 红移至 542 nm (以水作空白), $\Delta K = 16 \text{ nm}$; 同时, 温度的改变对荧光猝灭也有较大影响, 图 5 表明随着温度的升高荧光猝灭率 (F/F_0) 降低。由于吸收光谱的改变和荧光猝灭作用随温度升高而降低是静态猝灭反应的两个重要特征^[18], 并且在一定条件下猝灭剂浓度与 F/F_0 值成正比, 因此由上述两实验结果可推断丁卡因对赤藓红荧光猝灭是

电荷密度分别为 -0.366 和 -0.249 , 因此在弱酸性条件下, 前者更易质子化而使 TA#HCl 成为带一个正电荷的阳离子 (HTA⁺), 此时 ET⁻ 阴离子与 HTA⁺ 阳离子借静电引力和疏水作用力而形成 1B1 型电中性离子缔合复合物, 其结合反应如下:

种静态猝灭。

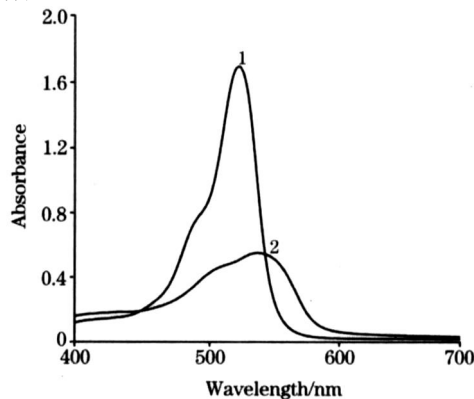


Fig 4 Absorption of ET and TA#HClET

1: ET; 2: TA#HClET

$c_{\text{ET}} = 4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{TA\#HCl}} = 3.10 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 4.0

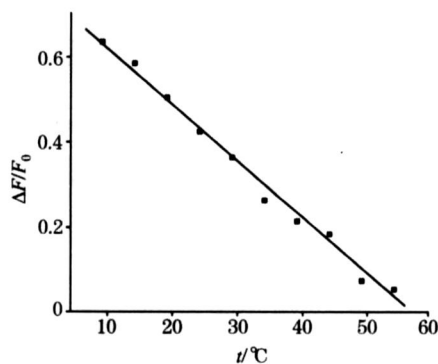


Fig 5 Effect of temperature

2.5 标准曲线

在 10 mL 比色管中, 依次加入 11.00 mL pH 4.0 的 BR 缓冲溶液, 2.00 mL $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的赤藓红溶液和适量的 $3.00 \text{ Lg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸丁卡因溶液。用水稀释至刻度, 摇匀, 10 min 后, 按实验方法测量荧光强度, 并用 F 对盐酸丁卡因的浓度作标准曲线, TA#HCl 浓度在 $0.28 \sim 41.8 \text{ Lg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与荧光猝灭值呈良好的线性关系。标准曲线的回归方程为 $F = -0.52 + 2.503 \alpha (\text{Lg} \cdot \text{mL}^{-1})$, 相关系数为 $C = 0.9992$, 检出限为 $0.083 \text{ Lg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 可见方法具有较高的灵敏度。

216 共存离子的影响

考察了 24 种共存物质对实验的影响, 结果列于表 1 中。
从表中可以看出常见的糖类、氨基酸、淀粉及盐类物质对该

体系的干扰都较小, 表明方法具有较好的选择性和潜在的
实际应用价值。

Table 1 Effects of coexistent substance ($c_{TA\#HCl}=310\text{ Lg}\#\text{ mL}^{-1}$)

共存物质	浓度/(Lg# mL ⁻¹)	相对误差/%	共存物质	浓度/(Lg# mL ⁻¹)	相对误差/%
麦芽糖	50 000	- 21 4	L2半胱氨酸	250	- 41 8
乳糖	5 000	- 31 2	NaCl	2 950	21 8
葡萄糖	5 000	51 2	NH ₄ NO ₃	50 000	- 01 1
蔗糖	5 000	41 4	FeCl ₃ *	300	51 6
淀粉	3 220	- 11 8	KI	239 000	- 11 1
人血清蛋白	250	41 9	CuCl ₂	725	61 0
L2色氨酸	12 000	- 61 0	MnSO ₄	2 500	- 31 6
D2色氨酸	100	11 1	NaAc	164	- 21 1
苯丙氨酸	250	01 7	AlCl ₃	500	- 21 3
DL2天氨酸	50	31 4	Zn(Ac) ₂	115	41 6
甘氨酸	56	- 11 7	CaCl ₂	2 800	21 4
尿素	2 500	51 3	MgSO ₄	350	61 1

* 加入 01 mol# L⁻¹ EDTA 11 0 mL

3 分析应用

311 人血清样的测定

15 份人血清样品各取 11 00 mL, 每份加入 21 0 mol# L⁻¹ 三氯乙酸 01 25 mL, 混合后, 3000 r# min⁻¹ 离心分离 5 min, 使血清中的蛋白质沉淀完全^[9]。取上层清液 01 50 mL, 依次加入 11 00 mL BR 缓冲溶液和 21 00 mL 赤藓红溶液, 用二次蒸馏水定容至 101 0 mL, 摇匀。按实验方法每种浓度平行测定 5 份, 并用标准加入法检查了方法的回收率, 结果列于表 2。

312 人尿样的测定

取过滤后的新鲜人尿 11 00 mL 于比色管中, 然后依次加入 11 00 mL 缓冲液、21 00 mL 赤藓红溶液, 定容至 101 0 mL, 摇匀。按实验方法每种浓度平行测定 5 份, 并用标准加入法检查了方法的回收率, 结果见表 2。

由表 2 看出, 方法用于血清和尿液中丁卡因的测定, 重复性好, 相对标准偏差 01 73%~ 11 3%, 准确度高, 平均回收率 951 7%~ 1031 4%。为临床分析中丁卡因血药和尿药浓度的监测及药代动力学的研究提供了新的方法, 为科学合理、安全有效地使用丁卡因提供了有价值的依据。

Table 2 Determination results of TA# HCl in the human serum and urine liquid samples

样品	测得 TA# HCl/(Lg# mL ⁻¹)	加入 TA# HCl/(Lg# mL ⁻¹)	测得值(n= 5)					回收率/%	RSD/%
血清 1	0	11 2	11 21	11 20	11 21	11 19	11 22	1001 5	01 95
血清 2	0	21 4	21 38	21 37	21 36	21 41	21 39	991 3	01 81
血清 3	0	31 6	31 75	31 68	31 74	31 67	31 78	1031 4	11 3
尿样 1	0	11 2	11 14	11 16	11 15	11 14	11 15	951 7	01 73
尿样 2	0	21 4	21 41	21 44	21 41	21 39	21 43	1001 7	01 80
尿样 3	0	31 6	31 47	31 55	31 50	31 49	31 52	971 4	01 87

参 考 文 献

[1] ZHANG Cu2lian, ZHANG We2qi, ZHANG Sh2yun, et al(张翠莲, 张伟琪, 张涉云, 等). J. of Chinese Pharmaceutics(中国药学杂志), 1999, 34(6): 415.
[2] Pasekov H, Polasek M. Talanta, 2000, 52(1): 67.
[3] Kitade T, Kitamura K, Hayakawa J, et al. Anal. Chem., 1995, 67(20): 3806.
[4] Montero R, Gallego M, Valcarcel M. Anal. Chim. Acta, 1988, 215(122): 241.
[5] Tanaka E, Nakagawa Y, Zhang S X, et al. Hochudoku, 1995, 13(1): 11.
[6] Wang Jiansong, Lu Jinrong, Zhang Lingxia, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 32(2): 381.
[7] Zhang Zhaohui, Zhao Qian, Kang Shaoying, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2006, 34(2): 165.

- [8] Terada M Islam, Mohammed N, Tun Z, et al. J. Anal. Toxicol., 1996, 20(5): 318.
- [9] WANG A₂jun, FAN Jing, FENG Su₂ling, et al(王爱军, 樊静, 冯素铃, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(3): 432.
- [10] SUN Yue, MA Li, WANG Hua₂you, et al(孙悦, 马骊, 王怀友, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(4): 637.
- [11] Editorial Committee of Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国国家药典委员会编). The Pharmacopoeia of the People's Republic of China(Vol. 0)(中华人民共和国药典二部). Beijing: People's Health Press(北京: 人民卫生出版社), 1990. 561.
- [12] ZHU Xing₂nian(朱兴年). Journal of West China Pharmaceutical Sciences(华西药科学杂志), 1998, 13(2): 115.
- [13] Nevado J J Berzas, Pulgarin J A Murillo, Escudero O I Reillo. Appl. Spectrosc., 2000, 54(11): 1678.
- [14] BAI Lin, WANG Jin, HUANG Xia₂wu, et al(白林, 王瑾, 黄晓舞, 等). China Pharmacist(中国药师), 2005, 8(6): 481.
- [15] YOU Q₂dong(尤启冬). Pharm. Chemistry(药物化学). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2004. 91.
- [16] Mchedlov₂Petrosyan N O, Mayorge R S. J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1992, 88: 3025.
- [17] Wandruszka R V. CRC. Anal. Chem., 1992, 23: 187.
- [18] CHEN Gu₂zhen, HUANG Xian₂zhi, ZHENG Zhu₂zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). The Methods of Fluorescence Analysis(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 112.
- [19] The Medical Executive Department of Sanitation Ministry of the People's Republic of China(中华人民共和国卫生部医政司编). National Clinic Analysis Procedure, 2nd ed. (全国临床检验操作规程# 第2版). Nanjing: Southeast University Press(南京: 东南大学出版社), 1997. 193.

Fluorescence Quenching Reaction of Tetracaine Hydrochloride with Erythrosine and Their Analytical Applications

QIN Ming₂you, LIU Shao₂pu, LIU Zhong₂fang, HU Xia₂li*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715 China

Abstract In Britton₂Robinson (BR) buffer solution at pH 4.0, erythrosine(ET) reacts with tetracaine hydrochloride (TA# HCl) to form an ion association complex that quenches the fluorescence of erythrosine and has a compound ratio of 1 B 1. The measurement wavelength of fluorescence quenching was located at $K_{ex}/K_{em} = 525\text{ nm}/556\text{ nm}$. The linear range for TA# HCl is from $0.128\text{ Lg}\#\text{ mL}^{-1}$ to $4.8\text{ Lg}\#\text{ mL}^{-1}$, and its detection limit is $0.083\text{ Lg}\#\text{ mL}^{-1}$. The influence of coexisting substance was also inspected, and the result shows that this method has a better selectivity. Therefore, a new fluorospectrophotometry, being high sensitive, sample and rapid, was developed to determinate TA# HCl at trace amounts. The method has been applied to the determination of TA# HCl in human serum and urine samples with satisfactory results. In this study, the spectral characteristics and the optimum reaction conditions were discussed with quantum chemistry AM1 method.

Keywords Tetracaine hydrochloride; Erythrosine; Fluorescence quenching; Fluorospectrophotometry

(Received Oct. 19, 2006; accepted Jan. 22, 2007)

* Corresponding author