

• 论著 •

高效液相色谱-质谱法同时检测兔血浆中 3 种草乌成分

邱俏桦, 刘刚, 梁欢, 卢中秋, 洪广亮, 王志翊

(温州医学院附属第一医院急诊科, 浙江温州 325000)

【摘要】 目的 建立高效液相色谱-质谱检测血浆新乌头碱、乌头碱和次乌头碱浓度的方法。方法 采用 Agilent 1200 系列的高效液相色谱仪和 Bruker esquire HCT 质谱仪检测。兔血浆在碱性条件下经乙醚萃取, 以乙腈: 0.1% 碳酸氢铵 (60: 40) 为流动相, ZORBAX SB-C18 色谱柱分离, 质谱电喷雾离子化源 (ESI), 选择离子监测、内标法定量。结果 新乌头碱、乌头碱、次乌头碱 3 种物质的线性范围宽, 线性关系良好, 定量下限分别为 1.0、0.4 和 0.5 $\mu\text{g/L}$; 血浆的萃取回收率高, 在 84.17%~98.06%; 3 种成分的日内、日间精密度相对标准偏差均小于 10%。结论 该色-质联用分析方法准确、灵敏度高, 可用于急性草乌中毒患者的血浓度监控及药代动力学和毒代动力学研究。

【关键词】 新乌头碱; 乌头碱; 次乌头碱; 高效液相色谱-质谱

中图分类号: R286.0; Q503 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.02.017

Simultaneous determination of three components of wild aconite (草乌) in rabbit plasma by high performance liquid chromatography-mass spectrometer QIU Qiao-meng, LIU Gang, LIANG Huan, LU Zhong-qiu, HONG Guang-liang, WANG Zhi-yi. Emergency Department, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: LU Zhong-qiu, Email: lzq640815@163.com

【Abstract】 Objective To establish a high performance liquid chromatography-mass spectrometer (HPLC-MS) method for simultaneous determination of mesaconitine, aconitine and hypaconitine in rabbit plasma. Methods The HPLC instrument was Agilent 1200 series and the MS was Bruker esquire HCT series. The analytical column was packed with ZORBAX SB-C18. The mobile phase was acetonitrile: 0.1% ammonium bicarbonate (60: 40) and the flow rate was 0.6 ml/min. The rabbit plasma was extracted by diethyl ether. The selected ion was determined by electrospray ionization (ESI⁺). The peak area with the internal standard method was used for determination. Results Mesaconitine, aconitine and hypaconitine showed excellent linear relationship with wide linear range, and the limited determination were 1.0, 0.4, 0.5 $\mu\text{g/L}$ respectively. The plasma extraction recovery rate was high (84.17% - 98.06%), the intra-day relative standard deviation (RSD) and inter-day RSD were lower than 10% respectively at three concentrations for the three substances showing excellent stability. Conclusion The method is rapid, sensitive and can be used to monitor the blood concentration of toxic material in patients with Radix aconiti kusnezoffii (草乌) intoxication and to investigate pharmacokinetics and toxicokinetics.

【Key words】 mesaconitine; aconitine; hypaconitine; high performance liquid chromatography-mass spectrometer

乌头对风湿麻痹、关节疼痛、心腹冷痛、中风瘫痪、寒疝作痛、神经痛、疔疮等疗效强, 具有非成瘾性, 为常用中药, 但其有大毒, 使用不当可引起急性事件常有报道^[1-2]。乌头碱是乌头类植物所含有的有毒成分, 口服 0.2 mg 即可中毒, 口服 3.0~4.0 mg 即可致死, 其死亡原因主要为心律失常和呼吸衰竭^[3-4]。乌头类中药中的主要成分为具有剧烈毒性的新乌头

碱、乌头碱和次乌头碱, 对心脏等组织具有明显的毒性作用^[5]。有关其毒性成分的检测方法对快速诊断具有重要意义。本研究中采用高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 法同时检测血浆新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的浓度, 用以草乌中毒的毒代动力学研究时的血浆药物浓度检测。

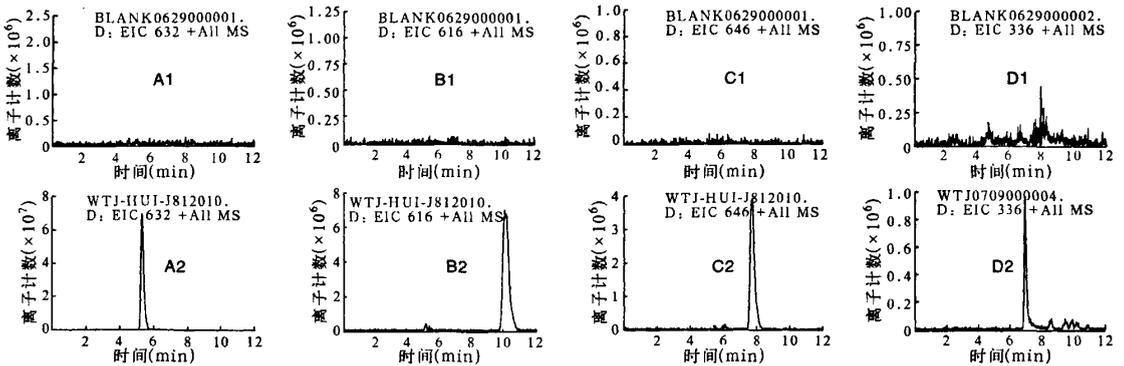
1 材料与方法

1.1 实验试剂及药品: Agilent 1200 系列高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)、Bruker esquire HCT 质谱仪 (德国 Bruker 公司); 乙腈 (德国 Merck 公司), 甲醇、乙醚、二氯甲烷 (均为天津市四友生物医

基金项目: 浙江省医学扶植重点建设学科计划项目 (07-F04); 浙江省中医药管理局基金项目 (2006C094)

通信作者: 卢中秋, Email: lzq640815@163.com

作者简介: 邱俏桦 (1970-), 女 (汉族), 浙江省人, 副主任医师。



A:新乌头碱的质子流图;B:乌头碱的质子流图;C:次乌头碱的质子流图;D:小檗碱质子流图;①空白血浆,②样品血浆

图 1 新乌头碱、乌头碱、次乌头碱和内标小檗碱的质子流图

表 1 3 种检测物的加样终浓度及血浆标准曲线回归方程

检测物	最终浓度(μg/L)	浓度范围(μg/L)	回归方程	相关系数(r)
新乌头碱	1.0 2.5 5.0 10.0 25.0 50.0 100.0 200.0 500.0 1 000.0	1.0~1 000.0	Y=15.471 057X+0.400 753	0.999 7
乌头碱	0.4 0.8 1.0 2.0 4.0 8.0 10.0 11.0 20.0 100.0	0.4~ 100.0	Y=22.746 615X-0.059 246	0.999 4
次乌头碱	0.5 1.0 2.5 5.0 7.5 10.0 20.0 30.0 40.0 200.0	0.5~ 200.0	Y=26.842 338X+0.003 073	0.999 7

学技术有限公司产品),碳酸氢铵(上海试剂总厂);新乌头碱、乌头碱、次乌头碱和小檗碱标准品(中国药品生物制品检定所)。

1.2 色谱条件:色谱柱选择 ZORBAX SB-C18 柱(2.1 mm×150.0 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司);保护柱选择 SB-C18 柱(2.1 mm×12.5 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司);流动相为乙腈:0.1%碳酸氢铵(60:40),流速为 0.6 ml/min,柱温 30 ℃。

1.3 质谱条件:离子源为电喷雾离子化源(ESI),正离子检测;喷雾气体压力为 11.34 kg;毛细管温度 35 ℃;源电压 5.0 kV;管透镜补偿电压 15 V;选择离子检测 m/z 366(小檗碱)、m/z 632(新乌头碱)、m/z 646(乌头碱)、m/z 616(次乌头碱)。

1.4 血浆样品处理:取血浆样品 1 ml,加 500 μg/L 的小檗碱内标溶液 100 μl,混匀后加入 NH₃·H₂O 200 μl,混旋振荡 1 min,再加乙醚 5 ml,混旋振荡 5 min,离心 10 min,取上清液 4 ml,40 ℃水浴条件下氮气吹干,用 250 μl 流动相复溶。取 200 μl 于自动进样器样品瓶中,设定 10 μl 进样检测。

1.5 检测方法及结果

1.5.1 方法的专属性(图 1):在色谱条件下,新乌头碱、乌头碱、次乌头碱和内标小檗碱峰形良好,血浆内杂质不干扰样品测定。

1.5.2 标准曲线的制备及定量下限(表 1):取不同量的新乌头碱、乌头碱、次乌头碱标准品应用液放入

10 支管中,各管中加入空白兔血浆 1 ml,使各碱的最终浓度达到表 1 水平,按上述方法处理后进行 HPLC-MS 检测,分别记录新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的峰面积和内标小檗碱的峰面积(A_x、A_w、A_c、A_i),以峰面积之比为纵坐标,以相对应各点浓度为横坐标绘制标准曲线。取标准曲线的下限为定量下限,新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的定量下限分别为 1.0、0.4、0.5 μg/L。

1.5.3 精密度实验:取不同量的新乌头碱、乌头碱、次乌头碱标准品,各加空白兔血浆 1 ml,按表 2 要求配制成最终浓度血浆标准溶液,每个浓度各 5 管。按血浆样品处理方法处理后,同一日内测定 5 次,计算日内精密度;连续测定 5 d,计算日间精密度。结果见表 2。

1.5.4 回收率实验:取不同量的新乌头碱、乌头碱、次乌头碱标准品,按表 2 要求配制成最终浓度的血浆标准溶液,加入 500 μg/L 小檗碱溶液 100 μl,混合后将溶剂挥干,残渣用 250 μl 流动相润旋溶解,取 10 μl 进入 HPLC-MS 分析,记录色谱图,并分别计算新乌头碱、乌头碱、次乌头碱面积与内标峰面积的比值(f_z)。

取兔空白血浆,加入不同量的新乌头碱、乌头碱、次乌头碱溶液,按表 2 要求配制成最终浓度的血浆 1 ml。以血浆处理方法处理(不加小檗碱),取上清液 4 ml,加入 500 μg/L 小檗碱溶液 100 μl,混合

后在 40 ℃ 水浴上氮气吹干,残渣用 250 μl 流动相涡旋溶解。取 10 μl 进入 HPLC-MS 分析,记录色谱图,计算新乌头碱、乌头碱、次乌头碱面积与内标峰面积的比值(fx)。按公式计算回收率(回收率=5fx/4fx×100%)。结果见表 2。

表 2 3 种检测物的精确度和回收率检测结果(n=5)

成分	浓度 (μg/L)	日内精密度 RSD(%)	日间精密度 RSD(%)	萃取回收率 (%)
新乌头碱	5.0	6.25	6.51	90.63
	50.0	4.52	5.01	84.17
	200.0	1.93	3.64	86.32
乌头碱	1.0	5.55	6.36	92.35
	8.0	6.12	6.53	94.42
	20.0	2.82	3.68	97.01
次乌头碱	2.5	5.75	5.89	95.21
	10.0	3.68	4.34	98.06
	40.0	2.91	3.12	96.95

注:RSD 为相对标准偏差

2 讨论

本实验中建立了新乌头碱、乌头碱、次乌头碱同时检测的 HPLC-MS 测定方法,具有准确、灵敏、简便、测得数据可靠的优点,对目标化合物及其内标同

时进行选择离子检测,空白血浆无杂质干扰。该方法的灵敏度高,新乌头碱、乌头碱、次乌头碱血浆定量下限分别为 1.0、0.4 和 0.5 μg/L,线性范围宽,线性关系良好;血浆的萃取回收率高,3 种物质的日内、日间精密度 RSD 均小于 10%,适用于草乌的浓度监控、药代动力学和毒代动力学研究,为探讨血液灌流治疗兔急性草乌中毒的实验方法提供可靠的检测方法^[6],也可用于急性草乌中毒患者血浓度的监测,对其诊治及预后判断有一定的临床意义。

参考文献

- [1] 卢中秋,胡国新.乌头碱急性中毒及诊治研究现状[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(2):119-121.
- [2] 周水红.25 例急性乌头碱中毒的临床总结[J].中国中西医结合急救杂志,2003,10(2):95.
- [3] 张颖,周玉华.乌头碱中毒致心律失常 68 例临床分析[J].中国危重病急救医学,1999,11(5):319.
- [4] 曹占勋.急性草乌和川乌中毒 10 例临床分析[J].中国中西医结合急救杂志,2003,10(6):371.
- [5] 刘刚,邱俏徽,卢中秋,等.急性草乌中毒兔血浆毒性成分及组织病理学改变的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(4):198-200.
- [6] 王志翊,邱俏徽,卢中秋,等.兔急性草乌中毒血液灌流治疗实验方法的建立[J].中国中西医结合急救杂志,2009,16(1):42-44.

(收稿日期:2009-02-03)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

CD4⁺淋巴细胞对肠上皮细胞凋亡的调控作用及脓毒症小鼠生存率的影响

淋巴细胞直接决定肠上皮细胞是增殖还是分化,但对细胞存活还是死亡的影响还未知。研究表明,在特殊情况下淋巴细胞对脓毒症肠上皮细胞凋亡起着调控作用。正常情况下 Rag-1 和野生型(WT)小鼠的肠上皮细胞凋亡基本相同,但在盲肠结扎穿孔术(CLP)模型中,Rag-1 小鼠肠上皮细胞凋亡是 WT 小鼠的 5 倍。Rag-1 小鼠和 WT 小鼠淋巴细胞的重建都是通过继发性转移减少肠细胞凋亡。细胞亚型分析表明,CD4⁺和 CD8⁺或 B 淋巴细胞对于肠上皮淋巴细胞凋亡起着重要作用。在 CLP 转基因(小)鼠中,Bcl-2 的肠特异性过度表达可明显降低致死率。这种存活的意义是,在转基因 Rag-1 小鼠中过表达时,相关淋巴细胞由于 Bcl-2 的肠特异性过度表达不能调控小鼠的存活。而 Rag-1 小鼠通过继发性转移淋巴细胞过度表达肠特异性 Bcl-2,导致脓毒症死亡率的变化。研究者认为,脓毒症 CD4⁺淋巴细胞并不是在内环境稳定下对肠细胞凋亡起调控作用,它在决定细胞存活和宿主致死率上起着双重作用。CD4⁺淋巴细胞对肠上皮细胞凋亡的调控作用影响脓毒症小鼠的存活率。

曲冰杰,编译自《FASEB J》,2009-01-21(电子版);胡森,审校

早期目标性循环优化治疗联合降温疗法救治院外心脏停搏的昏迷患者

院外发生心脏停搏(OHCA)的昏迷患者由于常存在与严重脓毒症相似的复杂病理变化,如心力衰竭、全身炎症反应、凝血机制障碍和脑损伤等,入院后病死率极高。一般认为降温疗法(TH)有助于改善 OHCA 患者的预后,而早期目标性循环优化治疗(EGDHO)也是改善严重脓毒症的有效方法。最近,国外学者观察了在心脏停搏后复苏(PCAR)过程中采用 EGDHO+TH 综合性措施对 6 h 内 OHCA 患者急救的效果。研究者将 2005 年 5 月—2008 年 2 月格拉斯哥昏迷评分(GCS)≤6 分的 OHCA 患者作为入选对象,采用 EGDHO+TH 综合方案进行救治,并将研究者所在医院 2001—2005 年 OHCA 治疗的回顾性病例作为对照。结果显示,采用 EGDHO+TH 综合性措施后,有 72% 的 OHCA 患者可达到 EGDHO 的效果,在 6 h 内恢复自主循环功能,从体温下降到达到目标体温(33 ℃)的时间平均为 2.8 h。采用综合性方案治疗的患者病死率为 50%(9/18),低于既往回顾性病例的病死率 78%(14/18,P=0.15)。研究者认为,在复苏 OHCA 患者过程中,可以采用 EGDHO+TH 的措施进行急救,以尽快恢复自主循环功能。

曲冰杰,编译自《Resuscitation》,2009,80(4):418-424;胡森,审校