

LC-MS/MS 快速测定生物检材中乌头碱的含量

高瞰, 邢俊家(中国医科大学附属第一医院药剂科, 沈阳 110001)

摘要: 目的 建立快速测定生物检材中乌头碱的 LC-MS/MS 方法。方法 生物检材经乙醚-二氯甲烷(3:2)提取后, 用 Venusil Mp-C₁₈ 柱进行分离, 采用 ESI 多反应监测(MRM)扫描方式。结果 测定的线性范围为 3~5 000 ng·mL⁻¹, RSD<1.8%, 日间和日内精密度分别为 2.5%和 4.6%, 提取回收率为 85.61%~89.04%。结论 该方法简便、快捷, 适用于生物检材中乌头碱的快速测定。

关键词: 乌头碱; LC-MS/MS; 生物检材

中图分类号: R917.103

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)08-0729-03

A Rapid Method for Determination of Aconitine in Biology Samples by LC-MS/MS

GAO Kan, XING Junjia(*The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a rapid method for determination of aconitine in biology samples by LC-MS/MS. **METHODS** Aconitine and the internal standard tramadol were extracted from biology samples using diethyl ether-dichloromethane (3:2), and separated on a Venusil Mp-C₁₈ column. Detection was carried out by multiple reaction monitoring (MRM) on a Q-trapTM LC-MS/MS system with an ESI interface in the positive ion mode. **RESULTS** The linear arrang was 3-5 000 ng·mL⁻¹. The accuracy was 1.8% and the intra- and inter-day precision were 2.5% and 4.6%, respectively. The recovery was between 85.61% and 89.04%. **CONCLUSION** This method is simple and rapid, which can be used for the determination of aconitine in biology samples by LC-MS/MS.

KEY WORDS: aconitine; LC-MS/MS; biology samples

川乌、草乌、附子等为毛茛科乌头属植物, 具有抗炎、镇痛、局部麻醉等作用。但该属中药所含乌头碱(aconitine)既是有效成分又是剧毒成分, 其治疗量与致毒、致死量接近, 加之对药物耐受性的个体差异及药物炮制等原因, 常引起乌头碱中毒^[1]。

目前已经报道的乌头碱在生物检材中的检测方法有 HPLC^[2-3]、衍生化 GC/MS, 还有 LC-MS/MS^[4-6]。HPLC 样品前处理较为繁琐, 或是保留时间较长^[3]; 衍生化 GC/MS 法还涉及分析前的衍生化; LC-MS/MS 虽缩短了分析时间(例如 1.19 min)且有较高的灵敏度(LOQ 为 2 ng·mL⁻¹)^[6], 但是加入两倍血浆样品体积的乙腈溶

液沉淀血浆中的蛋白, 大大增加了基质效应, 增加了内源性物质的干扰, 也容易使精密的仪器和色谱柱受到污染。

本试验报道了生物检材(血、尿、肝、肾、胃内容)中测定乌头碱浓度的 LC-MS/MS 分析方法。仅取 50 μL 或 0.5 g 的生物样品, 采用乙醚-二氯甲烷(3:2)提取, 提取回收率高, 且大大降低了基质效应, 乌头碱的保留时间约为 2.11 min, 总分析时间仅为 3.20 min, 检测限为 3 ng·mL⁻¹。

1 仪器与药品

1.1 仪器

Q-trap 型三重四极杆串联质谱仪, 配有电喷雾离子化源以及 Analyst 1.3 数据处理软件(美国

作者简介: 高瞰, 女, 硕士, 助教 Tel: (024)83282157 E-mail: highlook821010@163.com

Applied Biosystem 公司); Agilent 1100 高效液相色谱系统, 包括二元输液泵, 自动进样器, 切换阀(美国 Agilent 公司)。

1.2 药品与试剂

乌头碱对照品(中国药品生物制品检定所, 含量: 99.5%, 批号: 0763-200016), 内标曲马多对照品(中国药品生物制品检定所, 含量>99.8%, 批号: 20040608); 甲醇为色谱纯, 其它试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 LC-MS/MS 条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Venusil Mp-C₁₈ 柱 (4.6 mm×100 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(85:15); 流速: 0.8 mL·min⁻¹(50%分流); 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源: 离子喷雾离子化源; 离子喷射电压: 4 000 V; 温度: 500 °C; 源内气体 1(GS1, N₂)压力: 413.4 kPa; 气体 2(GS2, N₂)压力: 482.3 kPa; 气帘气体(N₂)压力: 103.4 kPa; 正离子方式检测; 扫描方式为多重反应监测(MRM); 乌头碱和内标曲马多的解簇电压(DP)分别为: 85 V 和 29 V; 碰撞能量(CE)分别为: 46 eV 和 40 eV; 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 646.5→ m/z 586.5(乌头碱)和 m/z 264.1→ m/z 58.0(内标曲马多)。

2.2 生物检材的处理

2.2.1 生物检材的预处理 精密取胃内容物 0.5

mL、肝脏 0.5 g、肾脏 0.5 g 分别置于具塞试管中, 加入 1.5 mL 甲醇, 匀浆, 超声 20 min, 离心 5 min(3 500 r·min⁻¹), 取上层清液转移至另一试管中, 清液过 0.45 μm 有机滤膜。

2.2.2 生物检材处理与测定 精密取血浆、尿液样品及上述预处理后的生物检材 50 μL, 分别置具塞试管中, 加入内标溶液(10 ng·mL⁻¹ 曲马多溶液)200 μL, 加入 50 μL 甲醇-水(1:1)混合溶液, 加入 0.1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃ 溶液 50 μL, 混匀, 加入 3 mL 提取试剂乙醚-二氯甲烷(3:2), 涡流混合 1 min, 往复振荡 10 min(240 次·min⁻¹), 离心 5 min(3 500 r·min⁻¹), 取上层有机相于另一试管中, 40 °C 氮气流下吹干, 残留物加入 200 μL 流动相溶解, 涡流混合, 取 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析。测定乌头碱的峰面积, 照标准曲线法, 按面积计算, 即得样品中乌头碱的浓度。

2.3 分析方法的确证

2.3.1 专属性 取空白血浆 50 μL, 除不加内标外, 按“2.2.2”项下操作, 进样 5 μL, 得色谱图 1-A; 将一定浓度的乌头碱标准溶液和内标加入空白血浆中, 同法操作, 得色谱图 1-B, 其中乌头碱的保留时间约为 2.11 min, 内标曲马多的保留时间约为 1.93 min; 取 50 μL 血浆样品, 同法操作, 得色谱图 1-C。色谱图 1-A 出峰位置并非是乌头碱的色谱峰, 而是质谱的切入峰。结果表明: 空白血浆中的内源性物质不干扰乌头碱和内标曲马多的测定。

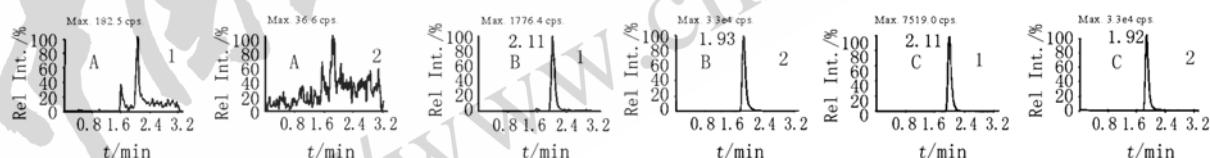


图 1 测定血浆样品中乌头碱和内标的典型 MRM 色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆中加入乌头碱(3 ng·mL⁻¹)和内标曲马多(10 ng·mL⁻¹); C-血浆样品; 1-乌头碱; 2-曲马多

Fig 1 Representative LC-MRM chromatograms for aconitine and tramadol

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with aconitine (3 ng·mL⁻¹) and tramadol(10 ng·mL⁻¹); C-plasma sample; 1-aconitine; 2-tramadol

2.3.2 标准曲线的制备和最低检测浓度 取空白血浆 50 μL, 加入乌头碱系列对照品溶液 50 μL, 配制成相当于血浆浓度为 3, 10, 30, 100, 300, 1 000, 5 000 ng·mL⁻¹ 的血浆样品。按“2.2.2”项下操作, 取 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析, 记录色谱图。以待测物浓度为横坐标 X (ng·mL⁻¹), 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标 Y , 求得的直线回归方程, $Y=0.005\ 03X+0.001\ 23$ ($r=0.997\ 5$)。表明乌头碱在 3~5 000 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好。以 $S/N>3$

计, 定量限为 3 ng·mL⁻¹(日间、日内精密度 RSD 分别为 2.2%和 1.9%)。

2.3.3 精密与准确度 按“2.2.2”项下操作, 制备乌头碱 10, 100, 1 000 ng·mL⁻¹ 3 个浓度的质量控制(QC)样品, 每个浓度 6 个样本, 连续测定 3 d。根据当日的工作曲线, 计算 QC 样品的测得浓度, 根据 QC 样品结果计算本法的准确度与精密。结果低、中、高 3 个浓度的 QC 样品测定值和添加值的相对误差(RSD)<1.8%, 日间、日内精密

度良好, RSD 分别为<2.5%和<4.6%。

2.3.4 稳定性试验 按“2.2.2”项下操作, 制备乌头碱 3 个浓度的 QC 样品, 每个浓度 3 个样本, 经室温放置 12 h、反复 3 次-20℃冰冻, 室温溶解、冰冻放置一个月后, 测定样品浓度。结果表明: 血浆样品室温放置 12 h(RSD 在±7.9%之内)、反复 3 次-20℃冰冻, 室温溶解(RSD 在±5.9%之内)、冰冻放置一个月后(RSD 在±8.2%之内)均稳定。

2.3.5 回收率试验 取空白血浆 50 μL, 按“2.2.2”项下操作, 制备乌头碱 3 个浓度的 QC 样品, 每个浓度 3 个样本。同时另取空白血浆 50 μL, 除不加对照品溶液和内标外, 按“2.2.2”项下操作, 再向获得的空白血浆上清液中加入标准溶液 50 μL 和内标溶液 200 μL, 配制成相应浓度, 涡流混合, 取 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析, 获得相应峰面积, 以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率, 血浆样品中乌头碱低、中、高 3 个浓度回收率分别为: (87.58±3.96)%, (89.04±1.27)%, (85.61±4.92)%。

2.3.6 基质效应 取空白血浆 50 μL, 按“2.2.2”项下操作, 制备乌头碱 3 个浓度的 QC 样品, 每个浓度 3 个样本。同时另取流动相溶液 50 μL, 代替空白血浆, 按“2.2.2”项下操作, 制备乌头碱 3 个浓度 QC 样品, 每个浓度 3 个样本, 取 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析, 获得相应峰面积, 以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算基质效应, 血浆样品中乌头碱低、中、高 3 个浓度基质效应分别为: (95.81±7.49)%, (92.67±5.65)%, (93.56±3.75)%。

2.4 方法的应用

某病患由于服用私家诊所自制的含有乌头碱的药丸而导致死亡。经死者家属同意, 提取死者的血液、尿液、胃内容、肝脏、肾脏, 以及服用的药丸进行测定。经 LC-MS/MS 法测定, 每粒药丸中平均含有 5.11 mg 乌头碱, 提供的生物检材中所含乌头碱量见表 1。乌头碱对成人的致毒量为 2 mg, 致死量为 3~5 mg, 故而导致其死亡^[7]。

表 1 乌头碱在生物检材中的浓度

Tab 1 The concentration of aconitine in biology samples

血浆 /ng·mL ⁻¹	尿液 /ng·mL ⁻¹	胃内容 /ng·mL ⁻¹	肝脏 /ng·g ⁻¹	肾脏/ ng·g ⁻¹
46.6	282.0	66.0	159.6	191.1

3 讨论

由于乌头碱是双酯型二萜类的生物碱, 所以极性较小, 使用有机相比比例较大的流动相可以将其洗脱下来。

由于试验中缺少空白基质, 所以标准曲线的制备以及分析方法的确证都是使用空白血浆作为空白基质, 可是这并不会影响对其他生物检材中乌头碱的定量。①在样品处理过程中加入的预处理后的样品量仅为 50 μL、进样量体积也仅为 5 μL, 这是为了使样品中的内源性物质尽量少的引入分析体系; ②极性也很小的乙醚-二氯甲烷(3:2)作为提取试剂对乌头碱的提取回收率很高, 而且对于水溶性的内源性物质也有很好的分离; ③提取中加入的 0.1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃ 也是为了提高乌头碱的提取回收率; ④基质效应试验也证明血浆中基本消除了基质效应(92.67%~95.81%)。

本试验建立了在生物检材中提取并测定乌头碱的 LC-MS/MS, 操作简便、快速、稳定。此方法可用作乌头碱中药制剂中毒的临床检测方法。

REFERENCES

- [1] GUO J Y. Practical Forensic Medicine (实用法医学) [M]. Changchun: Changchun Publishing House, 1995: 161-162.
- [2] JIN M, LI H H, WANG S, et al. A method for rapid separation and determination of aconitine in plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Chin J Forensic Med (中国法医学杂志), 2005, 20 (4): 215-217.
- [3] WANG Z H, GUO D, HE Y, et al. Quantitative determination of aconitum alkaloids in blood and urine samples by high-performance liquid chromatography [J]. Phytochem Anal, 2004, 15(1): 16-20.
- [4] HAYASHIDA M, HAYAKAWA H, WADA K, et al. A column-switch LC/MS/ESI method for detecting tetrodotoxin and aconitum alkaloids in serum [J]. Legal Med, 2003, 5(5): S101-S104.
- [5] BEYER J, PETERS F T, KRAEMER T, et al. Detection and validated quantification of toxic alkaloids in human blood plasma-comparison of LC-APCI-MS with LC-ESI-MS/MS [J]. J Mass Spectrom, 2007, 42(5): 621-633.
- [6] ZHANG R S, YU C, LIU G Y, et al. Detection of aconitine and mesaconitine and hypaconitine in blood by LC/MS/MS [J]. Chin J Forensic Med(中国法医学杂志), 2004, 19 (5): 265-267.
- [7] DING C J, MENG Q, LI H B, et al. Quantitative determination of aconitine and its clinical application [J]. Chin Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2003, 23 (1): 16-17.

收稿日期: 2009-03-27