

反相高效液相色谱法测定全血中马钱子碱和土的宁的含量

王朝虹^{1,2}, 果德安¹, 胡春华²

(1. 北京大学药学院, 北京 100083; 2. 公安部物证鉴定中心, 北京 100038)

摘要 建立了反相高效液相色谱法定量分析全血中马钱子碱和土的宁含量的方法。该方法应用 Oasis[®] MCX 固相萃取小柱进行提取、采用 XTerra[™] RP₁₈ 色谱柱进行分离。在该条件下马钱子碱和土的宁的线性范围为 0.05~10 mg/L, 最小检出限为 0.15 ng。该方法测得马钱子碱和土的宁在低、中、高浓度下的回收率均在 90% 以上, 日内、日间精密密度均符合方法学要求。该方法灵敏、快速、准确, 适用于临床血药浓度监测和法医毒化检验。

关键词 固相萃取; 高效液相色谱法; 马钱子碱; 土的宁

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2003)04-0382-03

Determination of Brucine and Strychnine in Human Blood by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

WANG Zhaohong^{1,2}, GUO Dean¹, HU Chunhua²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China;

2. Institute of Forensic Science Ministry of Public Security, Beijing 100038, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the simultaneous determination of brucine and strychnine in human blood. The samples were pretreated with solid phase extraction using Oasis[®] MCX cartridges and the alkaloids were separated on XTerra[™] RP₁₈ column with UV detection at 254 nm. Calibration curves were linear within the range of 0.05–10 mg/L and the limit of detection was 0.15 ng for each alkaloid. The recoveries obtained from spiked blood for the two alkaloids were more than 90%. The intra-day and inter-day presisions were assessed at three mass concentration levels (0.5, 1.0, 2.0 mg/L), and the relative standard deviations were in the range of 1.7% to 9.4%. The method described was proved to be sensitive, rapid and accurate, and it can be applied to the identification and determination of the alkaloids for forensic and therapeutic drugs monitoring.

Key words: solid-phase extraction; high performance liquid chromatography; brucine; strychnine

马钱子又名番木鳖, 为马钱科植物 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子, 主要含吲哚类生物碱, 总碱含量约 3%~5%, 其中土的宁(番木鳖碱)含量约为 1.23%, 马钱子碱含量约为 1.55%。作为传统中药, 马钱子用于治疗风湿痹、麻木瘫痪、跌打损伤、类风湿关节炎等^[1]。土的宁和马钱子碱的半致死量 LD₅₀(小鼠)分别为 3.27~233 mg/kg(灌胃)和 1.53~19 mg/kg(腹腔注射)^[2], 土的宁对成人的致死量为 50~100 mg, 儿童的致死量仅为 15~30 mg^[3]。在欧洲和北美土的宁中毒多由于自杀、谋杀和吸毒引起。在我国马钱子中毒甚至死亡多见于临床用药过量。鉴于以上情况, 定量分析体液中马钱子碱和土的宁的含量对于临床中毒患者抢救和

法庭调查中的死因判断非常重要。

目前, 体液及组织中马钱子碱和土的宁的检验方法有颜色反应、薄层色谱法^[4]、气相色谱法^[3,5]、气相色谱-质谱联用法^[4,6,7]和高效液相色谱法^[8,9], 以气相色谱和气质联用法最为常见。但这两种生物碱的相对分子质量较大不易汽化, 应用气相色谱法需采用较高的柱温, 不仅保留时间长、灵敏度低, 而且易造成柱流失。正相高效液相色谱法分离马钱子碱和土的宁由于实验成本较高、不具有普遍应用性, 已很少使用。反相高效液相色谱法多采用普通 C₁₈ 色谱柱, 这种色谱柱由于硅醇基残留而导致碱性药物拖尾, 所以色谱行为也不理想。

本实验选择宽 pH 范围、高稳定性的 XTerra[™]

RP₁₈柱,因其中的有机硅氧烷单元存在使填料内部及表面硅醇基浓度降低,从而可以在碱性条件下进行样品分离而不损失柱效。在本文选定的色谱条件下,马钱子碱和土的宁保留时间短、峰形对称、灵敏度高、分离度好。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 600E 高效液相色谱仪;996PDA 检测器;Plus717 自动进样器;Millennium³² 色谱工作站(美国 Waters 公司);Millipore 纯水器(美国 Millipore 公司);XTerraTM RP₁₈ 色谱柱及保护柱、Oasis[®] MCX 固相萃取小柱(美国 Waters 公司)。

氯化铵、碳酸氢铵、甲醇、盐酸、氨水均为分析纯(北京化工厂);乙腈(色谱纯,Dikama 公司);流动相用水为去离子水;马钱子碱和土的宁对照品由公安部物证鉴定中心提供。

1.2 色谱条件

色谱柱:XTerraTM RP₁₈柱(5 μm,150 mm×4.6 mm i.d.),保护柱 XTerraTM RP₁₈柱(20 mm×3.0 mm i.d.);流动相:乙腈-10 mmol/L 碳酸氢铵(氨水调 pH 10.5)(体积比为 28:72),等度洗脱;流速 1.0 mL/min;检测波长 254 nm;柱温 30 °C;自动进样器温度 4 °C。

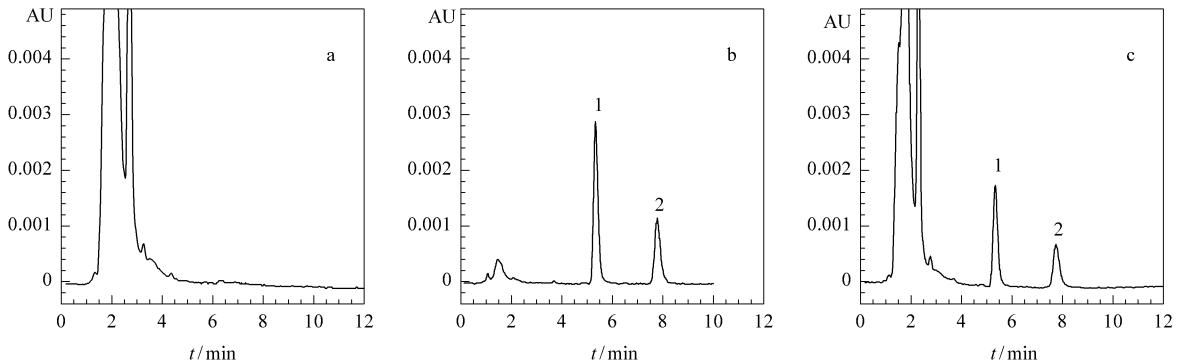


图 1 样品的高效液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatograms of samples

a. blank blood; b. standard solution; c. 1 mL blank blood spiked with 500 ng of brucine and strychnine.

1. brucine, $t_R = 5.4$ min; 2. strychnine, $t_R = 7.8$ min.

2.1 线性关系

精密吸取马钱子碱和土的宁对照样品溶液适量,加至 7 份空白全血(1 mL)中配制成含马钱子碱和土的宁分别为 0.05、0.1、0.5、1、2、5、10 mg/L 的对照样品溶液,按“1.4”节所述方法进行处理,在选定色谱条件下进行分析。分别以马钱子碱和土的宁峰面积 Y 对加入样品量(X ,mg)做校正曲线,得回归方程为:马钱子碱 $Y = 1.81 \times 10^3 X - 3.13 \times 10^3$,

1.3 标准溶液的配制

精密称取马钱子碱和土的宁对照品适量,加乙醇溶解,于容量瓶中定容,配制成质量浓度为 1 g/L 的浓储备液,保存于 0 °C 冰箱中备用。使用前稀释为 50 mg/L 的标准液。

1.4 样品预处理

在 1 mL 空白人全血(购于血站)中添加一定量马钱子碱和土的宁混合对照品,加 30 μL 磷酸酸化并以 4 倍体积蒸馏水稀释,涡旋混合,8000 r/min 离心 15 min,上清液过 Oasis[®] MCX 固相萃取小柱(预先以 1 mL 甲醇和 1 mL 水活化),相继以 1 mL 0.1 mol/L HCl 和 1 mL 甲醇淋洗杂质,弃去,精密吸取 1 mL 含 1 mol/L 氯化铵的 70% 甲醇(体积分数)溶液洗脱待测物,洗脱速度控制在 0.5 mL/min 以下。收集洗脱液,于旋转蒸发仪上减压 40 °C 蒸干,残渣用 1 mL 流动相溶解,涡旋混合,进样 20 μL 测定。

2 结果与讨论

在选定的条件下测定的 HPLC 色谱图见图 1。图 1-c 为 1 mL 空白血中添加 500 ng 马钱子碱和土的宁混合对照品色谱图,由该图可见两种生物碱分离效果较好;由图 1-a 可见,经预处理后的全血中无内源性物质干扰。

$r = 0.9995$,土的宁 $Y = 1.13 \times 10^3 X - 1.21 \times 10^3$,
 $r = 0.9994$ 。结果表明马钱子碱和土的宁全血浓度在 0.05~10 mg/L 时线性关系良好;以信噪比为 2 计,马钱子碱和土的宁的最小检出限为 0.15 ng。

2.2 回收率

于空白人全血(1 mL)中加入不同浓度的混合对照品溶液各 100 μL,使马钱子碱和土的宁的全血浓度分别为 0.1、0.5、1、2、5 mg/L,按“1.4”节所述

方法进行处理和测定。以此血样测得的马钱子碱和土的宁的峰面积与相应浓度混合标准溶液中马钱子碱和土的宁的峰面积计算回收率,见表 1。

表 1 回收率实验结果($n=3$)Table 1 The recoveries of brucine and strychnine in human blood($n=3$)

ρ (Component) γ (mg/L)	Recovery(mean \pm SD) γ %	
	brucine	strychnine
0.1	92.9 \pm 3.4	90.2 \pm 4.2
0.5	95.3 \pm 3.2	91.9 \pm 3.3
1.0	97.4 \pm 2.2	95.6 \pm 2.8
2.0	98.5 \pm 1.5	96.0 \pm 1.2
5.0	101.1 \pm 0.7	98.1 \pm 0.9

2.3 精密度和准确性实验

制备 0.5, 1, 2 mg/L 混合对照品全血样品, 在同一天内重复测定含量 4 次, 在不同日期分别测定 4 次, 测得日内精密度和日间精密度的见表 2。

表 2 精密度和准确性实验结果($n=4$)Table 2 Precisions and accuracies of brucine and strychnine in human blood($n=4$)

Comp.	ρ (Comp.) γ (mg/L)	Intra-day		Inter-day	
		RSD/%	accuracy/%	RSD/%	accuracy/%
Brucine	0.5	5.4	103.0	9.4	102.0
	1.0	3.2	99.6	4.2	99.8
	2.0	2.6	100.0	5.3	99.9
Strychnine	0.5	1.9	97.2	3.4	94.6
	1.0	2.8	91.2	7.5	91.3
	2.0	1.8	101.6	1.7	102.9

2.4 案例应用

应用本文方法对一死者(女, 30 岁)血样进行分析, 检出全血中马钱子碱含量为 2.87 mg/L, 土的宁含量 3.17 mg/L。

3 讨论

本实验中样品提取采用 Oasis[®] MCX 固相萃

取小柱, 该小柱使用杂化基质填料, 可利用离子交换和反相色谱两种机理吸附样品。本实验首先将血样酸化使马钱子碱和土的宁有效地离子化以进行离子交换吸附在固相萃取小柱上, 然后以 0.1 mol/L HCl 洗去酸性杂质, 以甲醇洗去中性杂质, 最后将马钱子碱和土的宁用含 1 mol/L 氯化铵的 70% 甲醇液洗脱下来。该方法操作简便, 使用有机溶剂少, 能有效去除全血中内源性杂质的干扰, 回收率高, 可作为快速、准确测定中毒患者血液中马钱子碱和土的宁的有效方法。

参考文献:

- [1] Xu Guojun. Pharmacognosy. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994. 309
徐国钧. 生药学. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 309
- [2] Li Huande, Xu Shuwu. Poison Detecting Diagnosis and Treatment of Acute Poisoning. Changsha: Hunan Science & Technology Press, 2000. 458
李焕德, 许树梧. 急性中毒毒物检测与诊疗. 长沙: 湖南科技出版社, 2000. 458
- [3] Ishii A, Hattori H, Seno H, Kumazawa T, Suzuki O. Journal of Forensic Sciences, JFSCA, 1995, 40(3): 483
- [4] Marques E P, Gil F, Proenca P, Monsanto P, Oliveira M F, Castanheira A, Viera D N. Forensic Science International, 2000, 110: 145
- [5] Winek C L, Wahba W W, Esposito F M, Collom W D. Journal of Analytical Toxicology, 1986, 10: 120
- [6] Rosano T G, Hubbard J D, Meola J M, Swift T A. Journal of Analytical Toxicology, 2000, 24: 642
- [7] Cingolani M, Froldi R, Mencarelli R, Rodriguez D. Journal of Analytical Toxicology, 1999, 23: 219
- [8] Mishima M, Tanimoto Y, Oguri K, Yoshimura H. Drug Metabolism and Disposition, 1985, 13(6): 716
- [9] Egloff Th, Niederwieser A, Pfister K, Otten A, Steinmann B, Steiner W, Gitzelmann R. J Clin Chem Clin Biochem, 1982, 20(4): 203