

## 液相色谱-串联质谱法测定生物检材中乌头生物碱\*

刘伟, 沈敏, 吴何坚, 向平

(司法部司法鉴定科学技术研究所, 上海市法医学重点实验室, 上海 200063)

**摘要** 目的: 建立检测生物检材中乌头生物碱的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法。方法: 取血液、尿液或肝组织 0.5 mL (g), 以丁丙诺啡为内标, 经 pH 9.2 的硼砂溶液碱化后, 用乙醚进行提取; 采用 Capcell Pak MG-II C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 2.0 mm, 5 μm), 以乙腈-pH 4 的 20 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵和 0.1% 甲酸的缓冲液 (70:30) 为流动相, 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, 采用电喷雾正离子模式离子化、多反应监测模式检测乌头生物碱, 内标法定量。结果: 血液、尿液和肝中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱与内标丁丙诺啡色谱分离良好, 乌头生物碱在 0.1~50 ng·mL<sup>-1</sup> (ng·g<sup>-1</sup>) 内均具有良好的线性, 相关系数 > 0.993, 最低检出限为 0.01~0.1 ng·mL<sup>-1</sup> (ng·g<sup>-1</sup>), 日内与日间精密度的 RSD 均小于 13.3%, 血液中乌头生物碱提取回收率不小于 64.8%。结论: 所建 LC-MS/MS 方法灵敏度高、操作简便、快速、准确, 适用于血液、尿液及组织等生物检材中痕量乌头生物碱成分的检测。

**关键词:** 法医毒理学; 液相色谱-串联质谱法; 乌头生物碱; 生物检材

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)12-2023-06

## Detemination of aconitum alkaloids in biological samples by liquid chromatography-tanden mass spectrometry\*

LIU Wei, SHEN Min, WU He-jian, XIANG Ping

(Institute of Forensic Science, Ministry of Justice, China, Shanghai Key Laboratory of Forensic Medicine, Shanghai 200063, China)

**Abstract Objective** To establish a method for detemination of aconitum alkaloids in biological samples by LC-MS/MS. **Methods** After 0.5 mL (g) of biological sample was extracted using a liquid-liquid extraction with diethyl ether at pH 9.2 and buprenorphine as an internal standard, aconitum alkaloids were separated on a Capcell Pak MG-II C<sub>18</sub> column (250 mm × 2.0 mm, 5 μm) using acetonitrile-buffer solution (20 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate and 0.1% formic acid, pH 4) (70:30) as the mobile phase at a flow-rate of 0.2 mL·min<sup>-1</sup> with LC-MS/MS in the positive ionization mode. Quantitative results were obtained by the internal calibration procedure. **Results** Aconitine, hypaconitine, mesaconitine and buprenorphine in blood, urine and liver were separated well. Calibration curve was linear with in the range of 0.1-50 ng·mL<sup>-1</sup> (ng·g<sup>-1</sup>) with the LOD range from 0.01 to 0.1 ng·mL<sup>-1</sup> (ng·g<sup>-1</sup>). The inter-day and intra-day RSD were less than 13.3%. The extraction recoveries of aconitum alkaloids in blood were more than 64.8%. **Conclusion** This method is sensitive, fast and accurate for detemination of trace aconitum alkaloids in biological samples.

**Key words** forensic toxicology; liquid chromatography-tanden mass spectrometry (LC-MS/MS); aconitum alkaloids; biological samples

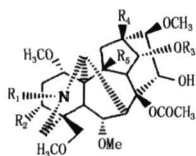
乌头属植物是最常引起中毒的有毒药物之一, 中毒多由服用乌头浸泡的药酒或煎煮的药汤过量或服用自采而又未经炮制的乌头植物导致, 乌头碱过量而中毒甚至死亡的案例屡有报道<sup>[1-5]</sup>。乌头属植物块根中含有多种生物碱, 其主要成分是双酯型二萜类生物碱, 共有 10 余种, 其中毒性最大、含量最大

的当数乌头碱 (aconitine), 其次为次乌头碱 (hypaconitine)、新乌头碱 (mesaconitine)、川乌碱甲 (carmichaeline A)、川乌碱乙 (carmichaeline B) 等。乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的结构式见图 1。

体内乌头生物碱的检测曾是困扰法医毒物分析

\* 中央级公益性科研院所专项基金资助项目 (GY0702); 上海市科委资助项目 (072512019)

第一作者: Tel: (021) 52352955; E-mail: liuweid806@yahoo.com.cn



| 化合物 (compound)       | R <sub>1</sub>                | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>                  | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> |
|----------------------|-------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|----------------|
| 乌头碱 (aconitine)      | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | OH             | COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> | OH             | H              |
| 新乌头碱 (mesaconitine)  | CH <sub>3</sub>               | OH             | COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> | OH             | H              |
| 次乌头碱 (hypoaconitine) | CH <sub>3</sub>               | H              | COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> | OH             | H              |

图 1 乌头生物碱的结构式

Fig 1 Structures of aconitum alkaloids

工作者的棘手难题,乌头成分复杂、体内代谢快速,已有的分析方法如薄层色谱法<sup>[6]</sup>和高效液相色谱法<sup>[7-9]</sup>在灵敏度、准确度等方面难以达到“痕量”的检测要求,无法为乌头中毒的法医学鉴定提供证据,而液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法具有液相色谱高效的在线分离能力和质谱的高选择性、高灵敏度的检测能力,可以同时得到化合物的保留时间、相对分子质量以及特征结构碎片等丰富的信息,尤其是串联质谱可从复杂基质中确认目标物,采用多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM),更可大大提高分析的专一性和灵敏度,完全有望解决复杂生物体系中痕量乌头生物碱成分的检测,因此LC-MS/MS法是目前检测体内乌头生物碱的最灵敏、最有效的方法之一,有关LC-MS/MS法检测体内乌头生物碱成分也有相关文献报道<sup>[10-12]</sup>,但仅限于对特定检材、特定目标物进行检测,缺乏对生物检材中乌头生物碱检测方法的全面考察。本研究利用LC-MS/MS技术,建立了生物体液和组织中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的测定方法,并对其定量方法进行了方法有效性验证,取得了满意的结果。

## 1 仪器与试剂

API 4000 串联三重四极杆质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司),配 Agilent 1100 高效液相色谱仪和 Agilent 1100 自动进样器(美国 Agilent 公司);TDZ4-WS 离心机(赛特湘仪离心机仪器有限公司);DK-S22 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂)。

对照品乌头碱(批号:110720-200410)、新乌头碱(批号:110799-200404)、次乌头碱(批号:110798-200404)和内标盐酸丁丙诺啡(批号:171244-200503)均购自中国药品生物制品检定所;

乙腈(HPLC 级)购自 Sigma 公司,甲酸(优级纯)和乙酸铵(HPLC 级)均购自 Fluka 公司,乙醚(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司,超纯水由 Milli-Q (Millipore 纯水系统)制得。

空白的血液、尿液均采自未服用过目标物的健康志愿者。空白肝为猪肝。

## 2 溶液配制

**2.1 对照品溶液** 精密称取对照品乌头碱、新乌头碱和次乌头碱各适量于 10 mL 量瓶中,加入甲醇溶解,稀释,定容,配成浓度均为 1 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品混合储备液,于 -18 °C 储存待用。实验中所用其他浓度的对照品混合溶液均从上述对照品混合储备液稀释而得。

**2.2 内标溶液** 精密称取对照品盐酸丁丙诺啡适量于 10 mL 量瓶中,加入甲醇溶解,稀释,定容,配成浓度为 1 mg·mL<sup>-1</sup>的丁丙诺啡储备液。取丁丙诺啡储备液用流动相稀释成 1 μg·mL<sup>-1</sup>的内标工作液。

**2.3 0.01 mol·L<sup>-1</sup>硼砂溶液 (pH 9.2)** 取 3.82 g 硼砂溶于水,再转移到 1000 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀即可。

## 3 LC-MS/MS 条件

**3.1 色谱条件** 色谱柱:资生堂公司 Capcell Pak MG-II C<sub>18</sub>柱(250 mm × 2.0 mm, 5 μm),前接 Phenomenex C<sub>18</sub>保护柱(4 mm × 2.0 mm);流动相:乙腈-20 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸铵和 0.1% 甲酸的缓冲液(称取乙酸铵 0.77 g 和 50% 甲酸 0.92 g 于 500 mL 量瓶中,加水溶解,定容至刻度)(70:30);流速:0.2 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:25 °C;进样量:5 μL。

**3.2 质谱条件** 电喷雾正离子化(ESI<sup>+</sup>),多反应监测(MRM)检测;离子源电压(IS):5.5 kV;碰撞气(CAD):41.37 kPa 气帘气(CUR):68.95 kPa 雾化气(GS1):137.9 kPa 辅助气 2(GS2):275.8 kPa 离子源温度(TEM):400 °C。

在以上色谱、质谱条件下,通过质谱参数优化,分别得到乌头碱、新乌头碱、次乌头碱和内标丁丙诺啡的母离子和各自的子离子,定性分析以 2 对母离子/子离子对进行,定量分析则选取其第 1 对母离子/子离子对,各离子对的驻留时间均为 50 ms。表 1 为乌头生物碱和内标丁丙诺啡的 LC-MS/MS 参数,它们的 MRM 色谱图见图 2。

表 1 乌头生物碱的 LC-MS/MS参数

Tab 1 LC-MS/MS parameters for aconitum alkaloids determination

| 化合物<br>( compound)                            | 定性离子对<br>( ion transition for qualitative<br>analysis), $m/z$ | 定量离子对<br>( ion transition for quantitative<br>analysis), $m/z$ | 去簇电压<br>( declustering<br>potential) $V$ | 碰撞能量<br>( collision energy)<br>/eV | $t_R$<br>/min |
|---|---|--|--|------------------------------------|---------------|
| 乌头碱 ( aconitine)                              | 646. 4/586. 1   | 646. 4/586. 1  | 100                                      | 46                                 | 3. 07         |
|   | 646. 4/526. 2   |  |  | 51                                 |               |
| 新乌头碱 ( mesaconitine)                          | 632. 0/572. 2   | 632. 0/572. 2  | 100                                      | 46                                 | 2. 88         |
|   | 632. 0/540. 3   |  |  | 58                                 |               |
| 次乌头碱 ( hypaconitine)                          | 616. 4/556. 2   | 616. 4/556. 2  | 100                                      | 45                                 | 3. 17         |
|   | 616. 4/524. 0   |  |  | 48                                 |               |
| 内标丁丙诺啡 ( buprenorphine,<br>internal standard) | 468. 1/396. 0   | 468. 1/396. 0  | 110                                      | 57                                 | 3. 99         |
|   | 468. 1/187. 2   |  |  | 52                                 |               |

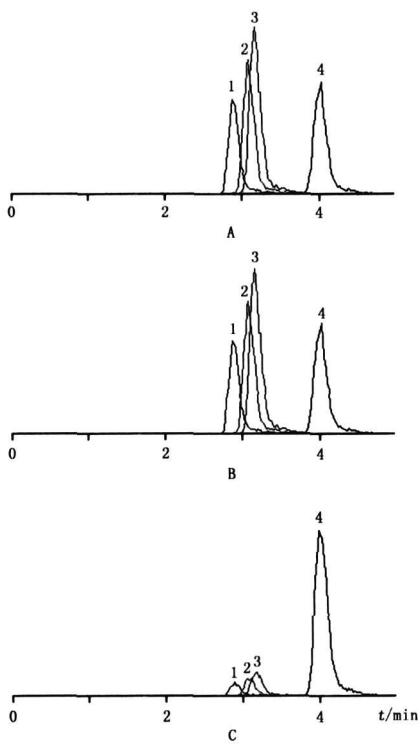


图 2 乌头碱、新乌头碱、次乌头碱和内标的 MRM 色谱图

Fig 2 MRM chromatograms of aconitum alkaloids and internal standard  
A. 空白血液添加  $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  对照品和内标 [ spike reference standards ( $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) and internal standard in blank blood] B. 空白尿液添加  $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  对照品和内标 [ spike reference standards ( $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) and internal standard in blank urine] C. 空白肝添加  $0.2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  对照品和内标 [ spike reference standards ( $0.2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) and internal standard in blank liver]

1 新乌头碱 ( mesaconitine) 2 乌头碱 ( aconitine) 3 次乌头碱 ( hypaconitine) 4. 内标丁丙诺啡 ( buprenorphine, internal standard)

#### 4 样品前处理方法

4.1 血液、尿液样品 取血液 (尿液)  $0.5 \text{ mL}$ , 加内标工作液  $10 \mu\text{L}$ , 加  $\text{pH} 9.2$  硼砂溶液  $0.5 \text{ mL}$  后, 用乙醚  $3 \text{ mL}$  提取, 涡旋混合  $2 \text{ min}$ ,  $1650 \times g$  离心  $3$

min 将有机层转移至另一试管中, 置  $55^\circ\text{C}$  水浴中挥干, 残留物用  $200 \mu\text{L}$  流动相溶解, 供 LC-MS/MS 分析。

4.2 组织样品 将肝研碎, 精密称取  $0.5 \text{ g}$  加内标工作液  $10 \mu\text{L}$ , 加  $\text{pH} 9.2$  硼砂溶液  $1.0 \text{ mL}$  浸泡  $0.5 \text{ h}$  后, 用乙醚  $3 \text{ mL}$  提取, 其后处理同“4.1”项。

#### 5 方法学验证

5.1 线性范围及最低检出限 分别取空白血液、空白尿液、空白肝各  $0.5 \text{ mL}$  (若干份, 加入内标工作液  $10 \mu\text{L}$ , 加入不同浓度乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照品溶液  $10 \mu\text{L}$ , 配制成质量浓度分别为  $0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱血液、尿液和肝的质控样品, 每一浓度 6 份, 以“4”项下方法进行样品前处理, 按“3”项下 LC-MS/MS 条件进样测定。以乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的浓度  $[X, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )] 与对相应的峰面积与内标物峰面积比  $(Y)$  作线性回归, 得到血液、尿液和肝的回归方程及相关系数, 并以信噪比  $(S/N) \geq 3$  的浓度测得检出限 (LOD)。结果见表 2。

5.2 准确度 分别取空白血液、空白尿液、空白肝样品各  $0.5 \text{ mL}$  (若干份, 同上法配制乌头碱、新乌头碱、次乌头碱低、中、高 3 个浓度 [分别为  $0.5, 5.0, 50.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )] 的质控样品, 以“4”项下方法进行样品前处理, 每一浓度 6 份, 按“3”项下 LC-MS/MS 条件进样测定。测得乌头碱、新乌头碱、次乌头碱与内标物的峰面积比值, 根据当日的工作曲线, 计算各样品的测得浓度 (实测浓度), 以实测浓度与理论浓度的比值计算准确度。结果血液中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的准确度范围分别为  $92.3\% \sim 103.5\%, 94.2\% \sim 108.2\%, 89.6\% \sim 106.4\%$ ; 尿液中分别为  $95.2\% \sim 105.4\%, 93.7\%$

表 2 血液、尿液和肝中乌头生物碱的回归方程、相关系数及 LOD

Tab 2 Regression equation, correlation coefficient and LOD of aconitum alkaloids in blood, urine and liver

| 检材<br>(sample) | 化合物<br>(compound)    | 回归方程<br>(regression equation) | 线性范围   | <i>r</i> | LOD /ng• mL <sup>-1</sup><br>(ng• g <sup>-1</sup> ) |
|----------------|----------------------|-------------------------------|--|----------|---|
|                |                      |                               | (linear range)<br>/ng• mL <sup>-1</sup> (ng• g <sup>-1</sup> ) |          |   |
| 血液 (blood)     | 乌头碱 (aconitine)      | $Y = 0.0173X - 0.0034$        | 0.1 - 50   | 0.9993   | 0.05  |
|                | 新乌头碱 (mesaconitine)  | $Y = 0.0716X + 0.0160$        | 0.05 - 50  | 0.9928   | 0.01  |
|                | 次乌头碱 (hypoaconitine) | $Y = 0.0961X + 0.0742$        | 0.05 - 50  | 0.9937   | 0.01  |
| 尿液 (urine)     | 乌头碱 (aconitine)      | $Y = 0.0013X + 0.0037$        | 0.1 - 50   | 0.9990   | 0.05  |
|                | 新乌头碱 (mesaconitine)  | $Y = 0.0065X + 0.0070$        | 0.05 - 50  | 0.9964   | 0.01  |
|                | 次乌头碱 (hypoaconitine) | $Y = 0.0093X + 0.0193$        | 0.05 - 50  | 0.9947   | 0.01  |
| 肝 (liver)      | 乌头碱 (aconitine)      | $Y = 0.0793X + 0.1080$        | 0.1 - 50   | 0.9966   | 0.1   |
|                | 新乌头碱 (mesaconitine)  | $Y = 0.9890X - 0.0544$        | 0.1 - 50   | 0.9984   | 0.05  |
|                | 次乌头碱 (hypoaconitine) | $Y = 0.1574X + 0.0979$        | 0.1 - 50   | 0.9964   | 0.05  |

~ 106.9%, 93.9% ~ 108.6%; 肝中分别为 94.1% ~ 103.7%, 92.2% ~ 109.1%, 91.5% ~ 112.5%。RSD ( $n = 6$ ) 均小于 10.3%。

**5.3 精密度** 分别取空白血液、空白尿液、空白肝样品各 0.5 mL (g) 若干份, 同上法配制乌头碱、新乌头碱、次乌头碱低、中、高 3 个浓度 [分别为 0.5, 5.0, 50.0 ng• mL<sup>-1</sup> (ng• g<sup>-1</sup>)] 的质控样品, 以“4”项下方法进行样品前处理, 每一浓度 6 份, 按“3”项下 LC-MS/MS 条件进样测定。连续测定 3 d 根据当日的工作曲线, 计算浓度, 求得本法的日内精密度、日间精密度。结果血液、尿液和肝中乌头生物碱的日内 RSD ( $n = 6$ ) 均小于 10.9%, 日间 RSD ( $n = 3$ ) 均小于 13.3%。

**5.4 提取回收率** 分别取空白血液、空白尿液、空白肝样品各 0.5 mL (g) 若干份, 同上法配制乌头碱、新乌头碱、次乌头碱低、中、高 3 个浓度 [分别为 0.5, 5.0, 50.0 ng• mL<sup>-1</sup> (ng• g<sup>-1</sup>)] 的质控样品, 以“4”项下方法进行样品前处理, 每一浓度 6 份, 按“3”项下 LC-MS/MS 条件进样测定, 得乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的峰面积 ( $A_1$ ); 同时另取空白血液、空白尿液、空白肝样品各 0.5 mL (g) 18 份, 以“4”项下方法进行提取, 在经溶剂提取挥干的残留物中加入乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照品溶液制成相应浓度的溶液, 每一浓度 6 份, 按“3”项下 LC-MS/MS 条件进样测定, 得其相应峰面积 ( $A_2$ )。以  $A_1/A_2 \times 100\%$  计算, 结果血液中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的提取回收率范围分别为 79.8% ~ 88.6%, 76.4% ~ 79.8%, 64.8% ~ 75.2%; 尿液中分别为 89.6% ~ 93.5%, 94.7% ~ 101.2%, 90.8%

~ 91.5%; 肝中分别为 41.3% ~ 45.0%, 34.1% ~ 41.0%, 31.5% ~ 41.7%。RSD ( $n = 6$ ) 均小于 9.2%。

**5.5 基质效应** 同上法配制乌头碱、新乌头碱、次乌头碱低、中、高 3 个浓度 [分别为 0.5, 5.0, 50.0 ng• mL<sup>-1</sup> (ng• g<sup>-1</sup>)] 的质控样品, 以“4”项下方法进行样品前处理, 每一浓度 6 份, 按“3”项下 LC-MS/MS 条件进样测定, 测得乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的峰面积设为  $S_1$ ; 另取相应浓度的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照溶液进样分析, 测得乌头碱、新乌头碱、次乌头碱物的峰面积设为  $S_2$ 。则基质效应 =  $S_1/S_2 \times 100\%$ 。结果血液中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的基质效应分别为 85.6% ~ 90.8%, 86.2% ~ 101.2%, 82.3% ~ 93.2%; 尿液中分别为 82.3% ~ 91.6%, 76.4% ~ 84.2%, 81.3% ~ 86.3%; 肝中分别为 92.2% ~ 104.2%, 62.7% ~ 67.4%, 73.3% ~ 76.8%。RSD ( $n = 6$ ) 均小于 5.7%。从结果中可见肝组织对新乌头碱、次乌头碱的离子抑制作用更大。

## 6 应用

2006年某日, 死者张某 (男, 41岁) 自服在某药店按游医处方购买的中药药汤 (含制川乌 5 g) 约 200 mL。0.5 h 后出现口唇、四肢发麻、恶心、腹泻等症状, 2 h 后送至医院抢救, 1 h 后死亡。自服药至死亡历时约 3.5 h。依本文所建方法对心血、尿液、肝组织等检材进行分析, 同时对死者生前所服中药煎锅中剩余棕色药汤经稀释后进行测定, 结果在以上检材中均检出乌头碱、新乌头碱和次乌头碱成分。表 3 为各检材中乌头生物碱的定量结果。

表 3 各检材中乌头生物碱的浓度 [ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} (\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$ ]

Tab 3 The concentrations of aconitum alkaloids in biological samples

| 样品 (sample)      | 乌头碱 (aconitine) | 新乌头碱 (mesaconitine) | 次乌头碱 (hypoaconitine) |
|------------------|-----------------|---------------------|----------------------|
| 心血 (heart blood) | 22.2            | 0.03                | 0.04                 |
| 尿液 (urine)       | 977.5           | 1.86                | 1.98                 |
| 肝 (liver)        | 27.6            | 0.12                | 0.05                 |
| 药汤 (decoction)   | 20500           | 45.8                | 34.7                 |

## 7 讨论

### 7.1 提取方法的优化

**7.1.1 萃取溶剂的选择** 为获得尽可能高的回收率, 本实验选用乙醚、乙酸乙酯、氯仿等作为萃取溶剂进行考察, 实验证明, 对提取尿液中乌头生物碱而言, 乙醚与乙酸乙酯的回收率较高, 而氯仿的回收率较差, 尤其是血液样品易产生乳化现象, 鉴于乙醚的提取回收率较高且易于挥发, 操作简便, 本研究采用乙醚为萃取溶剂。而对内标丁丙诺啡而言, 乙醚的提取回收率高且稳定。

**7.1.2 pH 的选择** 鉴于乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的分子中均含有 N 原子, 为较大极性的碱性化合物, 考虑用弱碱性条件进行提取, 实验结果表明, 选用弱碱性 (pH 9.2) 条件下用乙醚萃取生物检材中乌头生物碱, 回收率较高。

### 7.2 检测方法的优化

**7.2.1 流动相的选择** 为达到最佳离子化效率, 从而获得最佳灵敏度, 本研究对流动相的组成进行优化, 选用甲醇 -  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵和 0.1% 甲酸的缓冲液、乙腈 -  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵和 0.1% 甲酸的缓冲液、水 - 甲醇系列作为流动相, 经实验证实, 当选用甲醇 -  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵和 0.1% 甲酸的缓冲液、水 - 甲醇系列时, 峰形变差, 丰度明显降低, 导致灵敏度下降, 而用乙腈 -  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵和 0.1% 甲酸的缓冲液 (70:30) 作流动相时, 不仅能提高灵敏度, 而且能有效地改善色谱峰的拖尾现象。

**7.2.2 色谱柱的选择** 本实验在进行色谱条件优化时分别选用了多种规格的色谱柱, 其中包括 Zorbax SB- $\text{C}_{18}$  柱 (150 mm  $\times$  2.1 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Agilent 公司)、Waters 5C $_{18}$ -MS-II 柱 (150 mm  $\times$  2.0 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Cosmosil 公司)、Capcell Pak MG-II  $\text{C}_{18}$  柱 (250 mm  $\times$  2.0 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 资生堂公司) 和 Allure PFP Propyl 柱 (100 mm (2.1 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Restek 公司) 等, 实验结果表明 Allure PFP Propyl 柱属于五氟苯基键合

的固定相, 对碱性化合物有较强的色谱保留能力, 选择性较好, 但保留时间较长, 易于产生后拖尾现象; 而 Capcell Pak  $\text{C}_{18}$  色谱柱虽较长 (250 mm), 但对生物碱检测灵敏度高, 保留时间短, 整个分析过程可在 5 min 内完成, 用于多种生物碱成分的分离可得到较佳的效果, 特别适合于乌头生物碱的快速分析。

**7.2.3 质谱母离子、子离子的选择** 分别将乌头碱、新乌头碱、次乌头碱和内标丁丙诺啡的对照品储备液用流动相配制成  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液, 选用  $\text{ESI}^+$  离子化模式, 通过直接进样法, 在优化质谱参数和选择最佳对照品溶液的基础上, 确定两者的母离子质量数。实验结果发现: 在离子源  $\text{ESI}^+$  电离模式下, 采用全扫描方式可得到乌头碱、新乌头碱、次乌头碱和内标丁丙诺啡的  $[\text{M} + 1]^+$  准分子离子峰, 依次为  $m/z$  646.4  $m/z$  632.0  $m/z$  616.4 和  $m/z$  468.1, 以此作为它们的母离子。在确定母离子的基础上选择 2 个子离子, 采用 Product Ion 方式对子离子及碰撞能量进行优化选择, 通过改变碰撞能量值, 使得母离子的强度约占最大子离子强度的 1/3 最终选定母离子与丰度较大的 2 个子离子组成 2 对母离子/子离子对进行定性分析, 其中第 1 对离子作为定量离子对。乌头碱、新乌头碱、次乌头碱和内标丁丙诺啡的二级质谱图见图 3。就乌头碱而言,  $m/z$  586.1 和  $m/z$  526.2 是乌头碱的准分子离子 ( $m/z$  646.4) 在此软电离条件下的主要碎片离子, 乌头碱的准分子离子  $m/z$  646 失去 1 个分子乙酸产生碎片  $m/z$  586 此为二级质谱中丰度最高的碎片, 继而失去甲醇和乙烯 2 个中性分子产生碎片  $m/z$  526<sup>[13]</sup>。

**7.3 基质效应评价** 基质效应是 LC-MS(-MS) 方法评价的主要内容之一, 尤其是使用 ESI 方式进行检测。在 2001 年美国 FDA 发布的“生物分析方法确证指南”<sup>[14]</sup> 以及 2005 年我国国家食品药品监督管理局发布的“化学药物临床药代动力学研究技术指导原则”<sup>[15]</sup> 中均明确提出: 在以软电离质谱为基础的液相色谱-质谱法方法开发和确证过程中需对基质效应作出评价。在近年的与液相色谱-电喷雾电离-质谱法有关的基质效应问题也已多有报道<sup>[16-17]</sup>。基质效应的影响一般可通过选择合适的样品处理方法、选择合适内标、优化色谱条件和优化质谱条件等措施予以消除。

## 8 结语

本研究所建立的液相色谱-串联质谱法测定血液、尿液和组织中乌头生物碱的方法简便、快速、灵

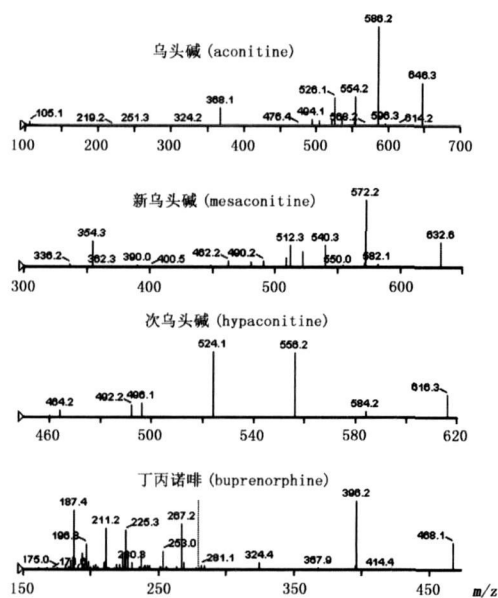


图3 乌头生物碱和内标丁丙诺啡的二级质谱图

Fig 3 MS/MS spectra of aconitum alkaloids and buprenorphine (internal standard)

敏、准确,能满足实际检案中生物检材中乌头生物碱的检测,为乌头中毒的法医学鉴定、临床诊断及救治提供科学的手段。

#### 参考文献

- Ito K, Tanaka S, Funayama M, *et al*. Distribution of aconitum alkaloids in body fluids and tissues in a suicidal case of aconite ingestion. *J Anal Toxicol*, 2004, 24(5): 348
- WANG Shuang(王爽), LI Shi-yang(李世洋). Rescue of common Chinese traditional medicines aconite poisoning(常见中药乌头中毒的救治). *Chin J Mod Drug Appl* (中国现代药物应用), 2007, 1(9): 30
- HE Yu-hua(何玉华). Treatment of a patient with aconite poisoning(乌头中毒 1例的救治). *Adverse Drug React J*(药物不良反应杂志), 2007, 9(3): 193
- Fujita Y, Tenui K, Fujita M, *et al*. Five cases of aconitine poisoning: toxicokinetics of aconitines. *J Anal Toxicol*, 2007, 31(4): 132
- FAN Chu-ming(樊楚明), ZHANG Tian-bin(张天斌). Analysis of 80 cases of aconites poisoning in elder patients(老年人乌头碱类药物中毒 80例分析). *J Emerg Med*(急诊医学), 1999, 8(8): 261
- WEI Zhi-wen(尉志文), LIU Jie(刘洁), YUN Ke-ming(负克明), *et al*. Rapid diagnosis of aconites poisoning by TLCs(薄层色谱扫描法快速检测乌头碱中毒). *Chin J Health Lab Technol*(中国卫生检验杂志), 2008, 18(9): 1746

- ZHANG Qi-yun(张启云), ZHU Zhan-jie(朱战杰), YU Ri-yue(余日跃), *et al*. Determination of aconitine, mesaconitine, hypaconitine in Radix Aconitilateralis Preparata by RP-HPLC(RP-HPLC法测定白附片中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱). *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2007, 13(12): 1
- LIU Xi-xiu(刘秀秀), ZHAO Ruo-bing(晔若冰). Determination of alkaloids in Radix Aconitilateralis Preparata by RP-ion-pair HPLC(反相离子对色谱法测定附子中生物碱成分). *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2006, 41(4): 365
- XIANG Jie(项杰), WANG Yang-xue(王阳雪), HOU Da-bing(侯大兵), *et al*. Determination of the effective compositions of Radix Aconitine by RP-HPLC(反相高效液相色谱法测定附子有效成分含量的方法研究). *J Sichuan Univ(Nat Sci Ed)* (四川大学学报 自然科学版), 2006, 43(1): 165
- ZHANG Hong-gui(张宏桂), TENG Kun(滕坤), LU Yong-gang(刘永刚), *et al*. Study on the metabolites of mesaconitine in rabbit urine(LC-MS<sup>n</sup>分析新乌头碱在兔尿液中的代谢产物). *Chin J Forensic Med* (中国法医学杂志), 2007, 22(6): 401
- ZHOU Di(周娣), PAN Guan-min(潘冠民). Detection of aconitine and mesaconitine and hypaconitine in biology samples by LC/MS/MS(生物检材中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的LC/MS/MS分析). *Mod Sci Instr*(现代科学仪器), 2005, 4: 65
- ZHANG Run-sheng(张润生), YU Chen(余琛), LIU Gang-yi(刘罡一), *et al*. Detection of aconitine and mesaconitine and hypaconitine in blood by LC/MS/MS(血液中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的LC/MS/MS分析). *Chin J Forensic Med* (中国法医学杂志), 2004, 19(5): 265
- ZHANG Hong-gui(张宏桂), SHI Xiang-guo(史向国), SUN Ying(孙莹), *et al*. Study on the metabolites of aconitine in rabbit blood(兔血液中乌头碱代谢产物的研究). *J Jilin Univ(Sci Ed)* (吉林大学学报 理学版), 2006, 44(2): 284
- FDA Guidelines Guidance for industry: Bioanalytical method validation. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>
- State Food and Drug Administration(国家食品药品监督管理局). Technical Principle of Clinical Pharmacokinetics Research of Chemicals(化学药物临床药代动力学研究技术指导原则); Drug research guideline(2005) [药物研究技术指导原则(2005年)]. Beijing(北京): China Medical Pharmaceutical Science and Technology Publishing House(中国医药科技出版社), 2005
- Abe E, Lan aie- Hurtel AS, Duvenueil C, *et al*. A novel LC-ESI-MS-MS method for sensitive quantification of colchicine in human plasma Application to two case reports. *J Anal Toxicol*, 2006, 30(3): 210
- Matyszewski BK, Constanter ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem*, 2003, 75: 3019

(本文于 2009 年 5 月 22 日修改回)