

## 【论著】

## HPLC法测定全血中秋水仙碱

陈晓红, 李小平, 姚浔平

(浙江省宁波市疾病预防控制中心, 浙江宁波 315010)

【摘要】 目的: 建立测定全血中秋水仙碱的简便、灵敏、准确的高效液相色谱二极管阵列 (DAD) 检测方法。方法: 全血样品经 1% 三氟醋酸乙腈溶液提取后, 用 Waters Oasis MCX 小柱进行净化, 在 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>8</sub> 柱 (150 mm × 2.1 mm × 5 μm) 上以乙腈 + 0.04% 三氟醋酸 (23+77) 为流动相, 二极管阵列 (DAD) 紫外 245 nm 检测, 柱温 35℃, 外标法定量。结果: 秋水仙碱在 0.50~50.0 mg/L 范围内均具有良好的线性, 血样中定量检出下限为 0.10 mg/L, 方法回收率为 88.1%~101.9%, RSD 小于 10%。结论: 该方法的建立具有灵敏度高、操作简便、快速、准确, 适用于中毒病人的中毒诊断。

【关键词】 全血; 秋水仙碱; 高效液相色谱; 二极管阵列

【中图分类号】 O657.7<sup>+</sup>2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1004-8685(2006)04-0418-03

## Determination of colchicine in whole blood by HPLC

Chen Xiao-hong, Li Xiao-ping, Yao Xun-ping

(Ningbo Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315010, China)

【Abstract】 **Objective** To establish a simple, sensitive and accurate method for the determination of colchicine in whole blood by HPLC-DAD. **Methods** After colchicine in whole blood was extracted by 1% Trifluoroacetic-Acetonitrile, the sample was cleaned with solid phase extraction using Oasis MCX cartridges and the colchicine was separated on ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>8</sub> column (150 mm × 2.1 mm × 5 μm) with DAD detection at 245 nm by using the mobile phase consisting of Acetonitrile (23%) and 0.04% Trifluoroacetic (77%). The column temperature was controlled at 35℃. **Results** Calibration curve was linear within the range of 0.50~50.0 mg/L and the limit of quantification was found to be 0.10 mg/L. The extraction recovery was between 88.1%~101.9%, the RSD was less than 10%. **Conclusion** This method is sensitive, fast and accurate for determination of trace colchicine in whole blood and can be used in the diagnosis of the clinical poisoned patients.

【Key words】 Whole blood; Colchicine; HPLC-DAD

秋水仙碱作为抗痛风药物在临床应用已多年, 它作为抗肿瘤药, 尤其是对乳腺癌有较好的疗效, 但是如果摄入过多就会引起中毒。成人一次食入 0.1~0.2 mg 的秋水仙碱即可引起中毒。一旦中毒, 便会出现咽干、烧心、口渴、恶心、呕吐、腹痛、腹泻等症状, 严重者可出现血便、血尿或尿闭等现象, 如果一次食入 20 mg 的秋水仙碱就可致人死亡。目前在药物中测定秋水仙碱大都采用电化学法、荧光光度法以及 HPLC-UV 检测法<sup>[1-3]</sup>, 但对于生物样品的检测国内还未见报道。本文采用乙腈 + 0.04% 三氟醋酸 (23+77) 为流动相, 二极管阵列 (DAD) 紫外 245 nm 检测, 高效液相色谱法测定全血中的秋水仙碱, 取得了满意的结果, 具有简便、快速、准确的优点。

## 1 材料与方法

## 1.1 试剂

乙腈为 HPLC 级 (Merck, Darmstadt, Germany); 三氟醋酸为 AR 级 (Merck, Darmstadt, Germany), 所有的溶剂使用前均用

0.45 μm 滤膜过滤。秋水仙碱 (含量 > 97.0%, Sigma 公司); 标准贮备液 (1.0 mg/ml); 准确称取 10.0 mg 秋水仙碱标准于 10 ml 容量瓶中, 用少量甲醇溶解后, 并用甲醇定容至刻度; 实验用水均来自 Milli-Q 纯水系统; 空白全血 (采自健康人静脉, 经肝素抗凝); Oasis MCX 固相萃取小柱 (3 ml/60 mg 美国 Waters 公司)。

## 1.2 仪器

Agilent 1100 series MSD Trap SL 型高效液相色谱-质谱联用仪, 包括四元泵、在线真空脱气机、DAD 检测器、柱温箱、自动进样器和 ESI 源 (美国 Agilent 公司); YXJ- 高速离心机 (常州澳森电器有限公司); VORTEX-GENE 2 型旋涡混合仪 (美国); KQ-2200 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 全玻璃溶剂过滤器 (美国 Waters 公司); HGC-24 型氮吹仪 (天津恒奥科技有限公司); Milli-Q 纯水系统 (美国 Millipore 公司); 2 ml 的具塞聚四氟乙烯离心管。

## 1.3 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>8</sub> 柱 (150 mm × 2.1 mm × 5 μm); 流速: 0.5 ml/min; 柱温: 35℃; 流动相: 乙腈 + 0.04% 三氟醋酸 (23+77)。

【作者简介】 陈晓红 (1967-), 女, 在职硕士, 副主任技师, 主要从事理化检测研究。

#### 1.4 样品处理

准确取 200  $\mu$ l 血样于 2 ml 具塞聚四氟乙烯离心管中, 加入 300  $\mu$ l 的 1% 三氟醋酸乙腈溶液, 于旋涡混合仪上混合 2 min, 超声 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液于另一离心管中, 再用 300  $\mu$ l 1% 三氟醋酸乙腈溶液重复提取一次, 合并有机相, 在 40 $^{\circ}$ C 水浴上用氮吹仪浓缩至干, 用 2 ml 0.05 mol/L HCl 溶解后过 Oasis MCX 固相萃取小柱 (预先以 2 ml 甲醇和 2 ml 水活化), 相继以 2 ml 0.05 mol/L HCl、2 ml 甲醇和 5% 氨水: 甲醇 (60:40) 淋洗杂质, 用 2 ml 含 5% 氨水: 甲醇 (10:90) 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, 在 40 $^{\circ}$ C 水浴上用氮吹仪浓缩至干, 残渣用 1 ml 甲醇溶解, 涡旋混合, 上机自动进样 (进样量为 5  $\mu$ l) 测定 (见图 1)。

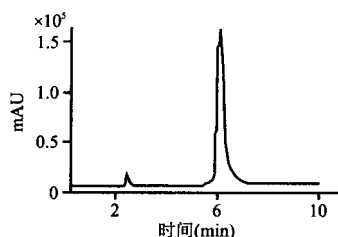


图 1 血样中秋水仙碱色谱图

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的优化

2.1.1 检测波长的选择 利用二极管阵列检测器在线扫描, 扫描波长为 200~400 nm, 得到秋水仙碱的紫外吸收光谱图 (见图 2), 本实验选择检测波长为 245 nm。

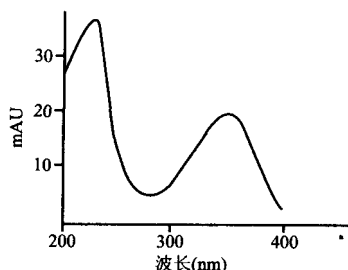


图 2 秋水仙碱 DAD 紫外波长扫描图

2.1.2 色谱柱的选择 本实验试验了 XDB C<sub>18</sub>、SB C<sub>18</sub> 及 XDB C<sub>8</sub> (均为 150 mm  $\times$  2.1 mm  $\times$  5  $\mu$ m) 3 种色谱柱采用不同比例的乙腈 + 0.04% 三氟醋酸为流动相进行分析的情况。结果表明, XDB C<sub>8</sub> 柱对秋水仙碱具有较高的灵敏度, 而且峰型尖、对称性好等优点。

2.1.3 流动相的选择 本文参照文献<sup>[4]</sup>选择乙腈-水体系作为流动相, 在水相中添加三氟醋酸调节 pH, 试验了添加不同浓度的三氟醋酸对检测秋水仙碱的影响, 实验表明, 添加低浓度的三氟醋酸不仅能提高灵敏度, 而且能有效地改善色谱峰的拖尾现象。

### 2.2 进样体系的选择

本文分别用乙腈、甲醇和流动相来配制标准溶液进行测定, 结果显示, 用秋水仙碱的乙腈溶液其峰型呈馒头型, 且拖尾。用流动相来配制标准溶液峰尖, 但存在一定的拖尾, 甲醇溶液的色谱峰尖且峰型对称。

### 2.3 全血中的提取条件

秋水仙碱为碱性化合物, 根据文献报道提取方法有酸化提取和碱化萃取两种<sup>[5-7]</sup>, 本实验利用三氟醋酸来沉淀蛋白, 用 1% 三氟醋酸乙腈溶液进行酸化提取。提取后的样品过固相萃取小柱进行净化。

### 2.4 清洗液、洗脱液的选择

提取后的样品过 Oasis MCX 固相萃取小柱 (预先以 2 ml 甲醇和 2 ml 水活化) 后, 依次用 0.05 mol/L 的 HCl 甲醇和 5% 氨水: 甲醇 (60:40) 进行清洗, 除去杂质。由于固相萃取柱是利用固体吸附剂吸附样品中的目标化合物, 使之与样品基体和干扰化合物分离, 然后再用洗脱液洗脱, 达到分离和富集目标化合物的目的。为此本文选择酸和碱进行清洗, 减少基体干扰, 清洗时为确保目标化合物不被洗下来必须控制一定的酸碱浓度。结果显示酸洗时 HCl 的浓度不能大于 0.05 mol/L, 而碱洗时甲醇的比例不能大于 45%。本文试验了各种比例的 5% 氨水与甲醇溶液, 甲醇比例小于 45% 时, 其洗脱能力为零, 随着甲醇比例的增大, 其洗脱能力也随之最大, 当甲醇比例达到 80% 时, 其洗脱能力为 100%, 为此, 本实验选用的清洗液甲醇浓度为 40%, 洗脱液甲醇浓度为 90%。

### 2.5 方法专属性

准确吸取 6 份健康人空白全血样品各 200  $\mu$ l 将一定浓度的秋水仙碱标准溶液加入空白全血中, 按 1.4 项进行操作测定, 用 1100 series MSD Trap SL 型高效液相色谱-质谱联用仪对色谱峰进行鉴定。结果表明, 样品的平均质谱图与秋水仙碱的标准质谱图完全一致, 所获得的色谱图具有高度的专属性, 秋水仙碱的质谱图 (见图 3)。

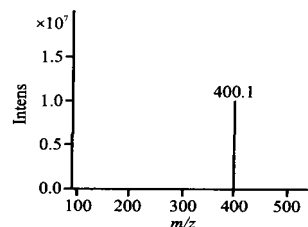


图 3 秋水仙碱标准一级质谱图

### 2.6 标准曲线和检出限

准确吸取 6 份健康人空白全血样品各 200  $\mu$ l 加入一定量的秋水仙碱标准液, 配制成相当于浓度为 0.045、0.90、4.50、18.00、45.00 mg/L 的秋水仙碱全血样品, 按上述条件进行测定, 以秋水仙碱的浓度 (X, mg/L) 对相应的峰面积 (Y) 进行线性回归, 得到回归方程及相关系数,  $Y = 88.6X - 0.9$ ,  $r = 0.9992$ 。目标组份在 0.45~45.0 mg/L 范围内均具有良好的线性, 按  $S/N = 3$  计算检出限为 0.10 mg/L。

### 2.7 方法的回收率和精密度

分别在 6 份 200  $\mu$ l 健康人空白全血样品中加入一定量的标准液, 其浓度分别为 0.50、5.00、45.0 mg/L 各 2 份, 按上述方法检测, 计算其回收率。每个样本重复测定 5 次, 方法回收率为 88.1%~101.9%,  $RSD$  小于 10%, 可满足临床检测要求。

### 2.8 模拟样品测定

在 5 份 1 ml 空白全血样品中加入一定量的标准液, 于旋涡混合仪上混合 2 min, 配制成浓度分别为 0.20、1.00、3.00、10.00、25.00 mg/L 的模拟样品, 按上述方法进行测定。每个

(下转第 494 页)

2.4 药敏试验  
详见表 4

表 4 福氏志贺菌 4c亚型药敏试验结果

药敏名称	结果	药敏名称	结果
氨苄青霉素	R	丁胺卡那	S
先锋塞肟	S	头孢拉定	S
复方新诺明	R	头孢噻肟	S
痢特灵	S	环丙沙星	R
头孢肤肟	R	氟哌酸	R
氯霉素	R	庆大霉素	R
红霉素	R	氟嗉酸	R
四环素	R	新霉素	S

‘S’:表示敏感;‘R’:表示耐药。

3 讨论

通过以上生化试验、血清学试验、噬菌体裂解试验等特性,可以证明这是一株志贺菌新菌型,在查阅有关资料<sup>[1,2]</sup>和目前的抗原对照表,以及国外曾有报道<sup>[3]</sup>来看,拟命名为福氏志贺菌 4c亚型,该菌型在我省属首次报道。世界各地流行的菌群,每二三十年发生一次变迁<sup>[4]</sup>。群型的划分对调查传染源,判断复发与再感染,了解流行菌群、菌型的变迁,以及菌苗制备均有重要意义<sup>[4]</sup>。所以,提醒广大菌种鉴定人员要注意新菌型的出现。

此次,腹泻患儿起初症状是下腹部持续性钝痛,伴有腹泻,为黄色稀水样便,每日 10余次,无里急后重,无发热,未予重视。此后,症状加重,大便性状为暗红色果酱样,量不多,每日 6~7次,并伴有低热 38.5℃,大便常规检查有脓细胞、红细胞。这些起初的不典型症状,提醒基层广大临床工作者,由于微生物的变异,一些疾病出现了不典型症状,所以在诊疗和检验中要细心观察,仔细分析,才不至于贻误治疗。

由于细菌为了生存,出现了生化特性的变异。此株细菌

与另两株<sup>[1,2]</sup>靛基质、阿拉伯糖试验结果出现异同。这说明在细菌的鉴定过程中,生化试验不能作为鉴定的单独的依据,必须结合形态特征、培养特性、血清学特征等综合判断。

通过药敏试验可以帮助临床医师选择效果更佳的药物进行抗感染治疗,并能了解本地区致病菌耐药性变迁情况。目前,抗生素耐药性问题已成为全球关注的焦点。我国是世界上滥用抗生素最为严重的国家之一,耐药菌引起的医院感染人数,已占到住院感染患者总人数的 30% 左右<sup>[5]</sup>。此次试验也不例外,如对治疗菌痢效果比较好的氟哌酸、庆大霉素等都出现了耐药性,而且氟哌酸试验结果本株与另两株<sup>[1,2]</sup>各不相同。细菌耐药性主要是由耐药性(R)质粒所介导<sup>[3]</sup>。通过耐药质粒传递的耐药现象在自然界所发生的细菌耐药现象中最重要,也最多见,在临床上占有重要地位<sup>[6]</sup>。R质粒能使细菌产生特异酶,可使抗菌药物失效,当微量诱导物如少量抗菌药存在时,即可产生大量特异酶,增加细菌耐药性。因此,建议临床使用抗菌药物应遵循以下原则:首先必须确诊为细菌感染;其次查找感染病原;再次进行药敏试验;根据病原种类,药敏结果以及药物自身和在人体内作用特点综合选用药物。预防因为滥用抗菌药物造成更多变异菌株的产生,危害人类身体健康。

[参考文献]

[1] 孙勇详,金以森,毛建勋,等.福氏志贺菌 4c亚型生物学特性研究  
ipaH 基因检测[J].中国卫生检验杂志,2005 15(5): 531- 532.  
[2] 余玮.一株 F4c型志贺菌的检出[J].现代预防医学,2003, 30  
(5): 730- 732.  
[3] 何晓晴.卫生防疫细菌检验[M].北京:新华出版社,1989. 226-  
673.  
[4] 吴文漪,查祖瑚.传染病学[M].南京:东南大学出版社,1999.  
[5] 周贵民,张军民.我国细菌耐药性监测应注意的几个问题[J].中  
华检验医学杂志,2004 27(1): 5- 6  
[6] 孙长贵.细菌对抗菌药物耐药性研究进展[J].临床检验杂志,  
2002 20(特刊): 70- 73.

(收稿日期: 2005- 10- 31)

(上接第 419页)  
样本重复测定 5次,结果见表 1。

表 1 模拟样品测定结果 (n= 5)

加入值 (mg/L)	测得值 (mg/L)	RSD (%)
0.20	0.193±0.008	2.64
1.00	0.967±0.047	2.93
3.00	2.942±0.105	4.08
10.00	9.354±0.235	6.40
25.00	24.687±0.547	6.75

3 小结

本文建立的高效液相色谱法二极管阵列检测器测定全血中秋水仙碱检测方法,它可为临床诊断提供科学的依据。

[参考文献]

[1] 卞晓岚,翟青,张芳华,等.高效液相色谱法测定复方秋水仙碱胶

囊中秋水仙碱的含量[J].广东微量元素科学,2004, 11(6): 41-  
44.  
[2] 于素华,胡效亚,冷宗周.碳糊电极阳极伏安法测定秋水仙碱  
[J].药学报,1997, 32(3): 210- 212.  
[3] 刘永明,李桂枝.荧光光度法测定片剂中秋水仙碱的含量[J].分  
析化学,2000 28(3): 330- 332.  
[4] 张润生,余琛,刘罡一,等.血液中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的  
LC-MS-MS分析[J].中国法医学杂志,2004, 19(5): 265- 267.  
[5] 王朝虹,叶敏,邢俊波,等.高效液相色谱/质谱法测定乌头碱在急  
性中毒大鼠体内的分布[J].色谱,2005 23(3): 316.  
[6] 王兆基,何绍基,徐树棋.液相色谱/质谱/质谱联用法测定乌头属  
药材及中成药中乌头类生物碱含量[J].分析化学,2001 29(4):  
391- 395.  
[7] R Dan s T Ben ijt s WE Lambert *et al*. Simultaneous detem ination of  
17 opim alkaloids and opioids in blood and urine by fast liquid chro-  
matography- diodearray detection- fluorescence detection, after solid  
- phase extraction[J]. J Chromatogr B 2002, 773(1): 53- 61.

(收稿日期: 2006- 01- 04)