

## UFLC - MS/MS 法测定中毒患者血清中秋水仙碱

李嘉琳 邱泽武 孙爱丽 孙成文\*

(军事医学科学院附属医院消化内科毒检室 北京 100071)

**[摘要]** 目的:利用快速高效液相色谱-质谱联用仪(UFLC-MS/MS)建立血清中秋水仙碱的快速定性定量分析方法,为临床中毒患者的快速诊治提供依据。方法:选用 Shim-pack XR-ODS 色谱柱,以乙腈 10 mmol/L 乙酸铵为流动相,采用梯度洗脱进行分离,流速:0.3 ml/min;柱温:40℃;进样量:10 μl。样品用乙腈进行蛋白沉淀后进样,多重反应监测(MRM)方式检测。结果:秋水仙碱的线性范围为 0.1 ng/ml ~ 1000 ng/ml,定量下限和最低检测限分别为 0.5 ng/ml 和 0.05 ng/ml。日内精密度(RSD)为 3.3%,日间精密度(RSD)为 3.8%。结论:本法快速、灵敏、重复性好,适用于秋水仙碱中毒患者血液标本的快速定性定量检测。

**[关键词]** 秋水仙碱;高效液相色谱-串联质谱法;中毒

**[中图分类号]** O657.63

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-8685(2012)11-2571-03

## UFLC - MS/MS determination of colchicine in blood of poisoned sufferers

LI Jia - lin , QIU Ze - wu , SUN Ai - li , SUN Cheng - wen\*

(Poison Examination Lab , Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100071 , China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an ultra fast liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UFLC - MS/MS) method for the determination of the colchicine in human serum and provide proof for the poisoners' diagnosis. **Methods:** Colchicine was extracted from serum by acetonitrile , and then separated on a Shim - pack XR - ODS column maintained at 40℃ with acetonitrile and 10 mmol/L ammonium acetate as mobile phase by gradient elution. The flow rate was 0.30 ml/min and injection volume was 10 μl. Detection was carried out by multiple reaction monitoring. **Results:** The assay was linear over the range of 0.1 ng/ml ~ 1000 ng/ml with quantitation limit of 0.5 ng/ml and lowest detection limit of 0.05 ng/ml. The relative deviation of intra - and inter - day were 3.3% , 3.8% , respectively. **Conclusion:** The method is rapid , sensitive and reliable and suitable for the determination of colchicine in human serum blood. The assay is applied to a fast qualitative and quantitative determination of colchicine poisoners.

**[Key words]** Colchicine; UFLC - MS/MS; Poison

秋水仙碱(colchicine),分子式:  $C_{22}H_{25}NO_6$ ,分子量: 399.45,化学结构式见图 1。

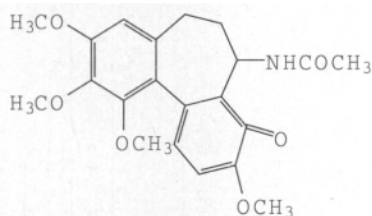


图 1 秋水仙碱的化学结构式

秋水仙碱是一种常见的有机胺类生物碱。在临床

上,它主要用于治疗急性痛风和家族性地中海热<sup>[1]</sup>。由于秋水仙碱的毒性较大,美国 FDA 已于 2010 年 10 月要求停止对单一成分口服秋水仙碱药品的销售。其常见的毒副作用有恶心、呕吐、腹泻、腹痛,胃肠反应是严重中毒的前驱症状,症状出现时即行停药,肾脏损害可见血尿、少尿、对骨髓有直接抑制作用、引起粒细胞缺乏、再生障碍性贫血。秋水仙碱的中毒剂量与治疗剂量非常接近,有报道称,短期摄入秋水仙碱超过 0.5 mg/kg 致死率显著升高<sup>[2]</sup>。因此,血液中秋水仙碱浓度的测定显得尤为重要。

本实验利用快速高效液相色谱-质谱联用仪建立了一种检测血清秋水仙碱的方法,为临床急慢性中毒患者的快速诊断和抢救提供了科学依据。

**[作者简介]** 李嘉琳(1980-),女,硕士研究生,助理研究员,主要从事临床毒物检测工作。

\* 通讯联系人 E-mail: suncw163@163.com

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

3200 型液相色谱 - 串联质谱仪(美国 Applied Biosystem) 配有电喷雾离子化源(ESI) 以及 Analyst 1.5. 数据处理软件; UFLC 快速高效液相色谱系统(日本岛津), 包括二元输液泵、自动进样器、切换阀和柱温箱; GL-88B 震荡器(江苏海门医疗器械厂)。

秋水仙碱对照品由中国标准物质中心提供; 乙腈、乙酸铵均为色谱纯; 其它试剂均为分析纯; 实验用水为经 0.45  $\mu\text{m}$  水膜滤过的重蒸水。空白血清: 解放军 307 医院血库提供; 中毒患者血液标本由北京市各医院急诊科提供 4 ml 全血, EDTA 抗凝。

### 1.2 溶液的配制

储备液的配制: 精密称取 1 mg 秋水仙碱对照品, 置于 100 ml 容量瓶中, 加入乙腈溶解, 稀释至刻度, 配制成 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的储备液。

标准系列溶液的配制: 取秋水仙碱储备液适量, 用 65% 乙腈稀释至 0.10 ng/ml、31.25 ng/ml、125 ng/ml、250 ng/ml、500 ng/ml、1000 ng/ml 待用。

### 1.3 色谱条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS 色谱柱(长度 100 mm, 直径 3 mm, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ )。流动相: 乙腈 10 mmol/L 乙酸铵梯度洗脱, 梯度条件见表 1。流速: 0.30 ml/min; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{l}$ 。

### 1.4 质谱条件

离子源: 离子喷雾离子化源, 正离子方式检测; 离子喷射电压(IS): 5500 V; 温度: 550  $^{\circ}\text{C}$ ; 源内气体 1 (Gas1) 压力: 60 psi; 气体 2 (Gas2) 压力: 65 psi; 气帘气体 (CUR) 压力: 30 psi; 扫描方式为多重反应监测(MRM); Q1、Q3 分辨率: Unit; 用于定量分析的离子反应分别为  $m/z400.1 \rightarrow m/z295.1$  (DP 电压: 62 V; CE 电压: 42 eV) 和  $m/z400.1 \rightarrow m/z358.2$  (DP 电压: 62 V; CE 电压: 28 eV)。

### 1.5 样品的提取及净化

取全血 4 ml, 离心取上层血清用 0.1 mol/L 的 NaOH 调 pH9.0。取血清 0.5 ml 加乙腈 1 ml 震荡器混匀 1 min。离心分离上清液 0.25  $\mu\text{m}$  滤器过滤至进样瓶待测。

## 2 结果

### 2.1 方法的优化

取秋水仙碱储备液, 用 65% 乙腈配制稀释至 1000 ng/ml, 采用针泵进样模式, 进行母离子、碎片离子分析, 选择 4 对离子反应定性, 分别为  $m/z400.1 \rightarrow m/z295.1$ 、 $m/z400.1 \rightarrow m/z358.2$ 、 $m/z400.1 \rightarrow m/z282.2$ 、 $m/z400.1 \rightarrow m/z310.2$ 。优化离子源参数及各对 DP、CE 参数 相应的母离子扫描图见图 2; 二级全扫描质谱图见图 3; 定性离子质量图见图 4; 秋水仙碱标准液的保留时间为 8.64 min(见图 5)。

### 2.2 方法的线性范围

取空白血清, 加入标准系列溶液配制成对照品血

清, 血清经处理后, 进样 10  $\mu\text{l}$  进行 UFLC-MS/MS 分析。每个浓度 5 个样本, 连续测量 3 d。以待测物峰面积(X) 对浓度(Y  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 绘制标准曲线, 得线性方程为  $y = 0.0024x - 6.3971$   $r = 0.9974$ 。

### 2.3 方法的检出限

选择  $m/z400.1 \rightarrow m/z295.1$  (DP 电压: 62 V; CE 电压: 42 eV) 和  $m/z400.1 \rightarrow m/z358.2$  (DP 电压: 62 V; CE 电压: 28 eV) 为定量分析的离子反应, 信噪比(S/N) 取 80:1, 标准液最低检出限可达到 0.05 ng/ml。

### 2.4 方法的回收率及精密度测定

取 0.1 ng/ml、100 ng/ml、1000 ng/ml 对照品血清, 用乙腈提取。每浓度 5 样本, 连续测定 3 d。根据当日的工作曲线, 计算样品的测得浓度, 进行回收率及精密度测定分析。结果显示, 三个浓度的平均回收率依次为 91.5%、89.6%、93.2%。日内精密度 RSD 为 3.3%, 日间精密度 RSD 为 3.8%。

表 1 梯度条件

时间( min)	乙腈浓度( % )
0.1	10
8.0	95
9.0	95
16	10

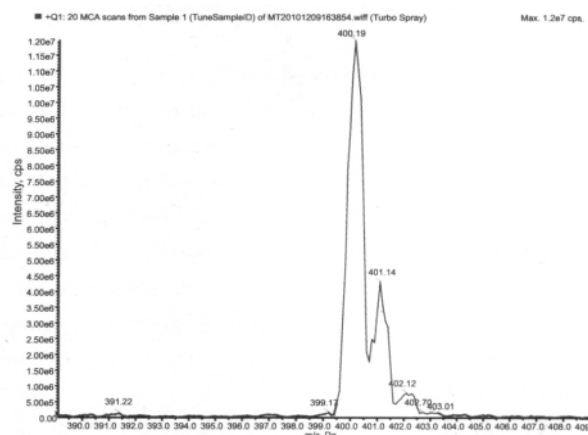


图 2 秋水仙碱母离子扫描图

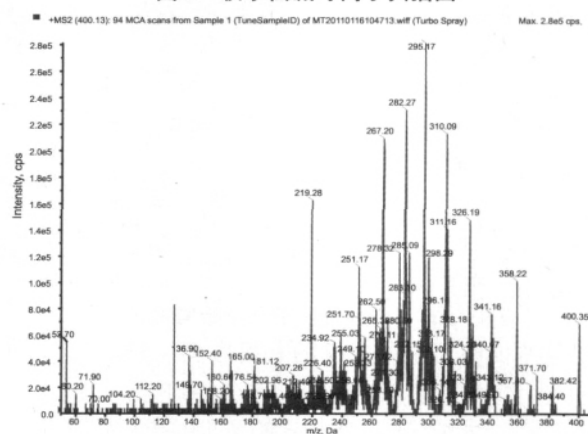


图 3 秋水仙碱二级全扫描质谱图

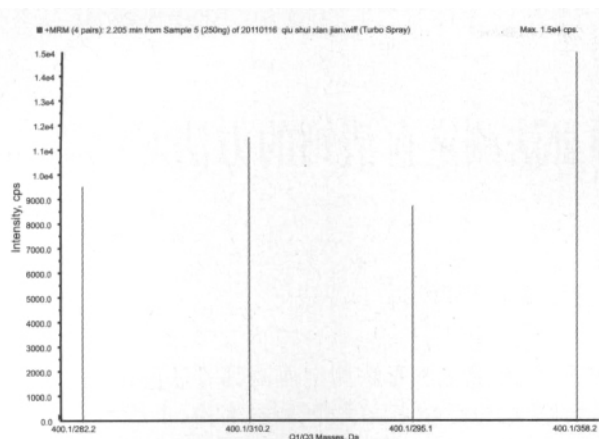


图 4 秋水仙碱定性离子质量图

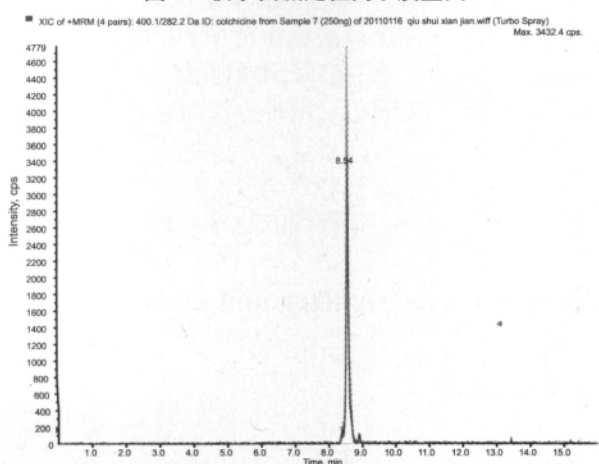


图 5 UFLC-MS/MS 测定人全血中秋水仙碱的典型色谱图

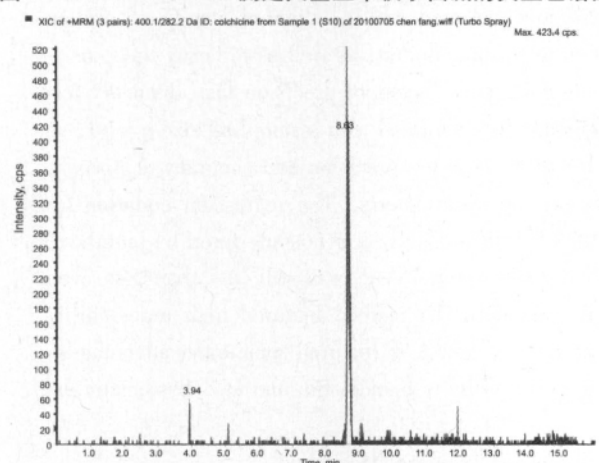


图 6 秋水仙碱中毒患者血清全扫描色谱图

### 3 讨论

临床上 秋水仙碱中毒患者主要以进食含秋水仙碱

的鲜黄花菜为多;其次是长期服用或未严格依照医嘱服用而造成的秋水仙碱中毒。还有因过量服用或静脉注射导致的中毒<sup>[3]</sup>。在临床上还要与急性胃肠炎、细菌性痢疾及原发的血液性疾病进行鉴别诊断。本方法采用的梯度洗脱条件,在保证灵敏度的前提下,能检出大多数临床常见药毒物,为临床快速救治提供参考。据本室检测记录统计 2008 年至 2010 年间 秋水仙碱中毒检测病例 15 例。临床上 秋水仙碱的治疗量应小于 2 ng/ml。

秋水仙碱血液含量很低,以往的检测方法多采用高效液相色谱法<sup>[4]</sup>,不能满足临床需要。本实验采用 UFLC-MS/MS 方法快速定量血清含量,选用 MRM 模式定量秋水仙碱药物浓度,选用较有特异性且丰度相对较高的 4 对反应离子,减少了非目标化合物的干扰,具有选择性好,灵敏度高,分析时间短,重复性好等特点。

### 4 临床应用

利用所建方法检测了 8 例胃肠炎症状入院疑似秋水仙碱急、慢性中毒患者的血清标本。结果 5 例中毒患者血清中检测到秋水仙碱,浓度范围为 2 ng/ml ~ 52 ng/ml。案例一:女,36 岁。服用秋水仙碱片 120 片约 60 mg 48 h 后送检,血清秋水仙碱浓度为 52.0 ng/ml,经治疗 72 h 后复测降至 11.1 ng/ml,96 h 后未检出,患者血清检测全扫描图见图 6,与秋水仙碱标准物质保留时间一致。案例二:男,59 岁,长期服用秋水仙碱 6 个月后送检血液,利用本方法检测血清秋水仙碱浓度为 8.2 ng/ml。案例三:女,77 岁,连续 48 h 服用秋水仙碱 7 mg,血清秋水仙碱浓度为 6.3 ng/ml。

### 5 结论

本方法针对中毒患者血清标本,采用乙腈提取,操作简单。利用气相色谱-质谱联用仪检测,建立了一种快速检测秋水仙碱的方法,为临床秋水仙碱急、慢性中毒患者的快速诊断和抢救提供了科学依据。

### [参考文献]

- [1] Ozçakar ZB, Kadioglu G, et al. The effect of colchicine on physical growth in children with familial mediterranean fever[J]. Eur J Pediatr, 2010, 169(7): 825-828.
- [2] Finkelstein Y, Aks SE, et al. Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug[J]. Clin Toxicol (Phila), 2010, 48(5): 407-414.
- [3] Rollot F, Pajot O. Acute colchicine intoxication during clarithromycin administration[J]. Ann Pharmacother, 2004, 38(12): 2074-2077.
- [4] 陈晓红, 李小平, 姚浔平. HPLC 法测定全血中秋水仙碱[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(4): 418-420.

(收稿日期: 2012-05-22)