

高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪测定小鼠钩吻素子中毒模型的研究

罗达龙, 钟家良*, 姚泳成

(梧州市食品药品检验所, 梧州 543002)

摘要: **目的** 通过动物急性钩吻素子染毒实验, 建立一种测定小鼠钩吻素子的高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用方法。**方法** 小鼠经钩吻浸泡药酒染毒后取材, 其血液、胃液、尿液通过1%甲酸乙腈沉淀蛋白后, 进行上机分析。采用5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸(A)和乙腈(B)作为流动相进行梯度洗脱, 质谱正离子化信号采用母离子模式和子离子模式对钩吻素子进行监测。**结果** 该实验结果显示1 h取材的动物样本, 经过分析, 胃液与尿液的差异性更大, 且胃内容物钩吻素子含量较高。**结论** 应急采样中, 优先提供胃液物进行检验, 其次到尿液。

关键词: 钩吻素子; 应急检验; 小鼠; 高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪

Determination of koumine poisoning model in mice by high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometer

LUO Da-Long, ZHONG Jia-Liang*, YAO Yong-Cheng

(Wuzhou Institutes for Food and Drug Control, Wuzhou 543002, China)

ABSTRACT: Objective Through the animal acute leucine poisoning experiment, to establish a method for the detection of koumine in animals by high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometer (HPLC-QTOF-MS). **Methods** After mice were poisoned with medicinal liquor, the protein in blood, gastric juice and urine of the mice were precipitated through 1% acetonitrile, and then analyzed by HPLC-QTOF-MS. Ammonium acetate-0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B) were used as mobile phases for gradient elution. Koumine were monitored by mass spectrometry electrospray ionization (positive) using the mother ion model and daughter ion model. **Results** The results showed that the difference between gastric juice and urine was greater, and the koumine content of gastric contents was higher. **Conclusion** In emergency sampling, the first priority is to provide gastric juice for testing, followed by urine.

KEY WORDS: koumine; emergency test; mice; high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometer

1 引言

钩吻(*Gelsemium elegans* (Gardn. & Champ.) Benth.)为

马钱科胡蔓藤属植物, 又名断肠草、猪人参等。钩吻可入药, 具有抗肿瘤、免疫调节、抗炎镇痛等药理作用, 但同时钩吻亦具有剧毒的性质, 过量摄入钩吻素子会导致呼吸

*通讯作者: 钟家良, 副主任药师, 主要研究方向为食品、药品质量与安全。E-mail: 136014396@qq.com

*Corresponding author: ZHONG Jia-Liang, Associate Chief Pharmacist, Wuzhou Institutes for Food and Drug Control, No.198, Xihuan Road, Wanxiu District, Wuzhou 543002, China. E-mail: 136014396@qq.com

中枢受到抑制而呼吸衰竭,严重者导致死亡^[1,2]。钩吻常见于广东、广西、贵州等地区,中毒患者多见为饮用含钩吻中药材的自酿中药药酒而导致中毒^[3],钩吻中毒的半数致死量极小中毒,中毒症状明显,根据中毒患者摄入剂量的不同,致死时间看见1~7 h^[4],据文献记载监测钩吻生物碱常见的主要方法有薄层色谱法^[5]、气相色谱法^[6]、液相色谱法^[7]、气相色谱-质谱联用^[8]、气相色谱-二级质谱联用^[9],当生物样品中含有蛋白质、油脂等杂质较多的时候,上述方法的灵敏度会相对高分辨质谱低,且高分辨质谱拥有相对定性更精确及更高的抗干扰能力,在制作色谱图时不会出现干扰信号。因此本研究通过建立小鼠对钩吻急性毒性中毒模型,探讨最佳的钩吻中毒筛查与检测方法,以期给与为临床应用相关提供指导性意见参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

HPLC-QTOF 高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪(美国安捷伦公司);台式冷冻离心机(德国 Sigma 公司);XPE 电子分析天平(0.01 mg,梅特勒-托利多仪器上海有限公司);AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪(睿科仪器有限公司);动物代谢笼(北京佳源兴业科技有限公司)。

钩吻素子对照品(koumine,纯度 $\geq 98.0\%$,成都曼思特生物科技有限公司)。

乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯,美国欧姆尼公司);SPE 固相萃取柱(型号 Creole PXC 60 mg/3 mL)、0.22 μm 有机滤膜(美国欧姆尼公司)。

KM 小鼠(雌性;级别:SPF 级;来源:梧州制药集团;批号:20180504;生产许可证号:SCXK 桂 2018-0002)。

2.2 实验方法

2.2.1 对照溶液的配制

精密称取钩吻素子 1.00 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加入 1%甲酸水支刻度,使成 100 $\mu\text{g/mL}$ 对照储备液。精密量取 1 mL 对照储备液至 100 mL 容量瓶中,加 1%甲酸水溶液稀释到刻度,使成 1 $\mu\text{g/mL}$ 对照品原液。使用对照品原液梯度稀释,得到浓度分别为 $S_1=10$ ng/mL、 $S_2=20$ ng/mL、 $S_3=40$ ng/mL、 $S_4=100$ ng/mL、 $S_5=200$ ng/mL 的标准品溶液制作工作曲线系列。

2.2.2 钩吻药酒的配制

钩吻药酒配制:称取 100 g 钩吻,放到酒瓶中,加 20°米酒 1000 mL,密封泡制 1 个月,制成钩吻药酒。

2.2.3 钩吻药酒的提取与净化

量取 2.5 mL 钩吻药酒于离心管中,加入 47.5 mL 1%甲酸水稀释,超声提取 30 min,4000 r/min 离心 15 min,取 20 mL 上清液于 50 mL 离心管中,振荡 3 min,4000 r/min 离心 15 min,取上清液 2.00 mL 直接上 PXC 柱(柱子先用甲

醇 3 mL 和水 3 mL 活化柱子),再用水 3 mL 和甲醇 3 mL 淋洗固相萃取柱,抽干,用 5%氯化甲醇 5 mL 洗脱,收集洗脱液,并于 40 °C 氮吹至干,用 0.1%甲酸乙腈 1.00 mL 定容,过 0.22 μm 有机滤膜,上 HPLC-QTOF 分析。

2.2.4 实验动物检材的制备

取 13 只 SPF 级 km 小鼠(雌性)分组,灌胃实验前禁食不禁水 1 d,10 只(编号 1~10)灌以上述提取后经稀释 10 倍的钩吻药酒(1 mL/10 g),3 只(编号 11~13)对照组灌以经稀释 10 倍的 20°米酒(1 mL/10 g),灌胃后放入代谢笼观察记录动物行为,1 h 后分别收集尿液、血液与胃内容物。

2.2.5 实验动物检材的提取与净化

(1) 尿液

收集代谢笼所得小鼠尿液,取适量加入 1%甲酸乙腈混匀(体液与 1%甲酸乙腈比例为 2:5),离心,取上清液上机分析。

(2) 血液

眼眶取血,血液置于肝素钠润洗过的离心管中混匀,离心取血液适量加入 1%甲酸乙腈混匀(体液与 1%甲酸乙腈比例为 2:5),离心,取上清液上机分析。

(3) 胃内容物提取液

取血完成后取下小鼠胃于 1%甲酸水溶液 2 mL 中剪碎常温浸泡 30 min,离心取上清液 0.4 mL,加入 1%甲酸乙腈 1.0 mL 混匀(体液与 1%甲酸乙腈比例为 2:5),离心,取上清液上机分析。

2.2.6 实验动物检材的回收率

分别取空白组小鼠的尿液、胃液、血液各 0.4 mL 加 S_2 标准品溶液 0.6 mL 配制成 1 mL 的基质加标准品溶液,按 2.2.5 同步处理,并分别测定其回收率。

2.2.7 仪器条件

(1) 液相色谱条件

Agilent HPH-C18 色谱柱(3 mm $\times$ 100 mm, 1.9 μm),流动相: 5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸(A)-乙腈(B),流速: 0.4 mL/min,进样体积: 1 μL ,柱温: 35 °C。液相色谱梯度洗脱程序: 0~2.0 min, 10%B~90%B; 2.0~5.0 min, 90%B。

(2) 质谱条件

干燥气温度: 150 °C;干燥气流量: 15 L/min;鞘气温度: 350 °C;鞘气流量: 12 L/min;

喷雾器压力: 25 psi;毛细管电压: 3500 V,钩吻素子: 母离子(m/z)307.1805,子离子(m/z)220.0995,碎裂电压: 380 V,碰撞能量: 40 V,进样体积 1 μL 。

3 结果与分析

3.1 钩吻素子理化数据分析

钩吻素子保留时间为 1.810 min,见图 1;根据 2.2.1 标准曲线方法中得到钩吻素子标准工作曲线 $Y=1085.455X+4154.099$, $r^2=0.998$ 。检出限(limit of detection,

LOD)为 0.3 ng/mL, 定量限(limit of quantitation, LOQ)为 1.0 ng/mL; 检材的回收率见表 1, 钩吻素子部分理化性质见表 2, 钩吻素子质谱谱图见图 2。

3.2 药酒中钩吻素子提取结果

按 2.2.3 方法提取钩吻中的钩吻素子, 利用 HPLC-QTOF 进行全扫描采集, 所得结果为提取液中钩吻素子浓度为 1.46 μg/mL。

3.3 动物实验结果分析

动物实验染毒过程中的表现与实验结果详见表 3~4。

3.4 HPLC-QTOF 数据的主成分分析

主成分分析是一种无监督的模式识别方法, 对数据降维处理之后, 能清晰直观的观察出样品各组分的差异^[10-13]。为了考察钩吻中毒后, 动物体内不同体液成分中的钩吻素子的差异, 本研究所得钩吻素子生物碱的相对含量进行归一化处理, 将数据经安捷伦公司 Mass Profiler Professional 软件主成分分析: 利用 t -test $P < 0.05$ 和强度倍数变化 $FC > 2$ 过滤, 分别得到各个主成分的 PCA 得分图。血液、胃液、尿液中钩吻素子主成分分析结果如图 3。

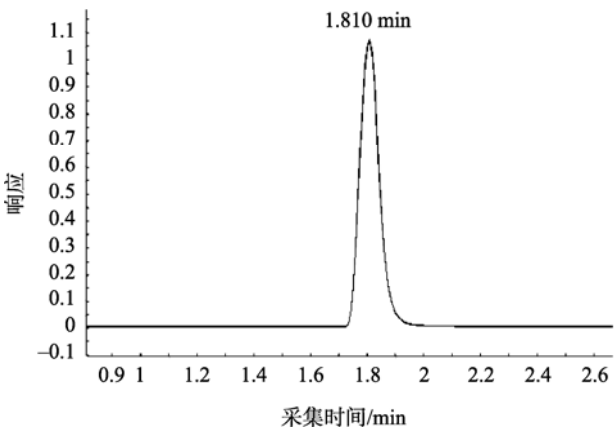


图 1 钩吻素子色谱图
Fig.1 The chromatogram of koumine

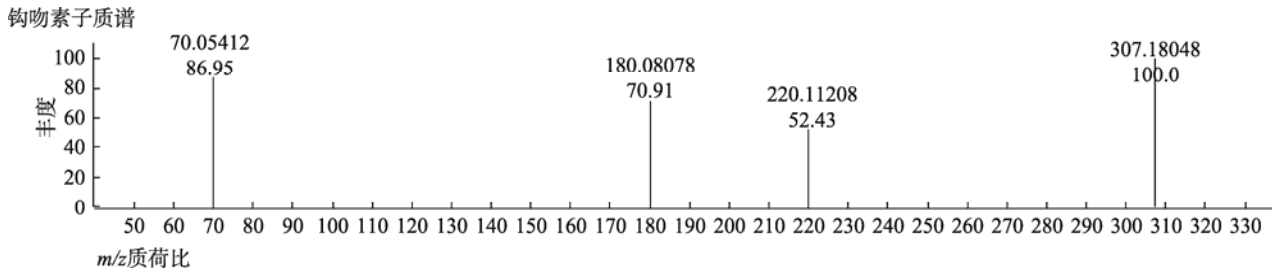


图 2 钩吻碱子的质谱谱图
Fig.2 The mass spectrogram of koumine

表 1 基质加标准品回收率				
Table 1 Recovery rate of matrix spiked with standard				
	预计浓度 /(ng/mL)	计算浓度 /(ng/mL)	最终浓度 /(ng/mL)	回收率 /%
尿液	12.00	11.82	11.92	99.33
胃液	12.00	11.81	11.91	99.25
血液	12.00	11.78	11.84	98.67

表 2 钩吻素子理化性质			
Table 2 Physicochemical properties of koumine			
化合物	分子式	分子质量	CAS
钩吻素子	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O	307.18048	1358-76-5

表 3 动物实验结果				
Table 3 Results of animal experiment				
鼠号	1 h 内动物表现	钩吻浓度/(ng/mL)		
		血液含量	尿液含量	胃液含量
1	呼吸急促, 惊厥	14.9461	608.3501	996.7688
2	呼吸急促, 惊厥, 给药后第 47 min 死亡	14.6458	654.8858	1051.54
3	呼吸急促, 惊厥	15.7133	626.7902	1219.3363
4	呼吸急促	15.1568	527.9067	1287.9475
5	呼吸急促	14.9317	569.01	1253.1443
6	呼吸急促	15.0966	501.5356	1233.3084
7	呼吸急促	15.6741	580.8462	1022.401
8	呼吸急促	19.4173	556.6157	1118.9404
9	呼吸急促, 惊厥, 给药后第 43 min 死亡	17.5529	571.6236	1214.7545
10	呼吸急促	15.0966	571.11	1194.2351
11	正常	未检出	未检出	未检出
12	正常	未检出	未检出	未检出
13	正常	未检出	未检出	未检出

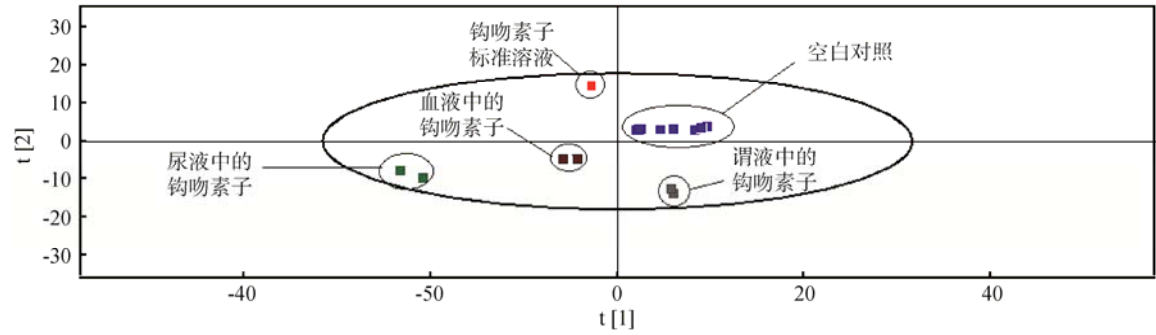


图 3 血液、胃液和尿液中钩吻毒素的主成分分析
Fig.3 Principal component analysis of tetrodotoxin in blood, gastric juice and urine

表 4 动物实验结果统计学分析 Table 4 Statistical analysis of animal experimental results			
	样本数(N)	各组分含量($\bar{x}\pm s$)	相对标准偏差/%
血液含量	10	15.82±1.51	9.51%
尿液含量	10	576.87±44.96	7.79%
胃液含量	10	1159.24±103.89	8.96%

4 结论与讨论

断肠草中毒起病快,按中毒量的多少临床表现,所以以临床症状、表现判断是否钩吻中毒有一定的难度^[14-16],且对于中毒的剂量分析、分析速度和准确性都极为重要。经本研究发现,通过采集中毒模型动物体内的血液、胃液、尿液 3 种体液测定模型动物体内的钩吻毒素数据的主成分分析,空白试剂、基质空白、基质加钩吻毒素对照液以及钩吻毒素能明显分散,所用提取方法、分析方法在对于基质(血液、胃液及尿液)中的钩吻毒素应用有效,其中胃液、尿液的差异性更大,但比较由于中毒 1 h 时胃液中的钩吻毒素浓度较大,且更易获得,所以应急采样中,建议优先提供胃液进行检验,其次可提供尿液做参考。

参考文献

[1] 许豪然,廖华军,王河山,等. 钩吻的研究进展[J]. 中国民族民间医, 2016, 25(10): 37-38.
Xu HR, Liao HJ, Wang HS, et al. Advances in the study of *Gukisheng* [J]. Chin Folk Med, 2016, 25(10): 37-38.
[2] 张志阳,伍勇,孙志良. 钩吻药效学的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(4): 57-60.
Zhang ZY, Wu Y, Sun ZL. Advances in pharmacodynamics of *Gelsemia hookosa* [J]. Chin J Vet Med, 2018, 54(4): 57-60.
[3] 穆琼,于洪婕,韦卫琴,等. 断肠草中毒临床救治体会[J]. 贵阳医学院学报, 2012, 37(2): 206-210.
Mu Q, Yu HJ, Wei WQ, et al. Experience in clinical treatment of enterotoxiosis [J]. J Guiyang Med Coll, 2012, 37(2): 206-210.

[4] 黄科勇,苏泽球. 钩吻中毒 24 例症状分析[J]. 刑事技术, 1980, (3): 12.
Huang KY, Su ZQ. Symptom analysis of 24 cases of hook poisoning [J]. Crimin Technol, 1980, (3): 12.
[5] 冯时茵,栗建明,侯惠婵,等. 钩吻生物碱成分的薄层色谱研究[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(1): 77-80.
Feng SY, Li JM, Hou HC, et al. TLC study on alkaloids *Gelsemia hookosa* [J]. New Chin Med Clin Pharm, 2013, 24 (1): 77-80.
[6] 裴茂清,陈鸿义. 钩吻生物碱的气相色谱分析方法[J]. 广东公安科技, 1999, (1): 42-44.
Pei MQ, Chen HY. Gas chromatographic analysis of alkaloids from *Gelsemia hookosa* [J]. Guangdong Publ Secur Sci Technol, 1999, (1): 42-44.
[7] 丘宏强,程昱,刘茂柏,等. 人血液中钩吻素甲和钩吻素子 HPLC-UV 测定[J]. 中草药, 2016, 47(13): 2324-2327.
Qiu HQ, Cheng Y, Liu MB, et al. Determination of gelatin A and gelatin Zi in human plasma by HPLC-UV [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2016, 47(13): 2324-2327.
[8] 蔡玉刚,张帆. 气相色谱-质谱联用仪测定生物检材中钩吻生物碱[J]. 低碳世界, 2016, (25): 267-268.
Cai YG, Zhang F. Gas chromatography-mass spectrometry for the determination of alkaloids in biological samples [J]. Low Carbon World, 2016, (25): 267-268.
[9] 陆亦在. 断肠草中毒的 GC-MS-MS 检测方法[J]. 医学检验与临床, 2013, (24): 84-86.
Lu YZ. GC-MS method for detection of enterotoxicity [J]. Med Lab Clin, 2013, (24): 84-86.
[10] 李雪,皮子凤,邢俊鹏,等. 超高效液相色谱-质谱结合主成分分析方法研究制川乌配伍前后的肠内菌代谢差异[J]. 分析化学, 2014, 42(11): 1646-1650.
Li X, Pi ZF, Xing JP, et al. Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry combined with principal component analysis was used to study the metabolic differences of intestinal bacteria before and after compatibility of Radix Aconiti Preparata [J]. Anal Chem, 2014, 42(11): 1646-1650.
[11] 曾茂茂,李洋,何志勇,等. 液相色谱-质谱联用法结合主成分分析考察食品中前体物质对杂环胺生成的影响[J]. 分析化学, 2014, 42(1): 71-76.
Zeng MM, Li Y, He ZY, et al. The effect of precursors in food on the formation of heterocyclic amines was investigated by LC-MS combined

- with principal component analysis [J]. Anal Chem, 2014, 42(1): 71–76.
- [12] Huang JT, Zhou Z, Gao ZH, *et al.* Aerodynamic multiobjective integrated optimization based on principal component analysis [J]. Chin J Aeronaut, 2014, 35(9): 2461–2471.
- [13] Lv HB, Qian M, Li CH, *et al.* The principal component analysis on yielding and agronomic traits of hybrid rice of Liangyou 21111 [J]. Agric Sci Technol, 2017, 18(3): 483–486.
- [14] 聂许妹, 麦伟丽, 黄翠连. 断肠草中毒的院前急救与护理[J]. 基层医学论坛, 2014, 18(21): 2876–2877.
- Nie XM, Mai WL, Huang CL. Pre-hospital first aid and nursing for intestinal grass poisoning [J]. Prim Med Forum, 2014, 18(21): 2876–2877.
- [15] 温金星. 断肠草中毒 18 例临床分析[J]. 基层医学论坛, 2013, 17(28): 3764–3765.
- Wen JX. Clinical analysis of 18 cases of enterotoxicity [J]. Prim Med Forum, 2013, 17(28): 3764–3765.
- [16] 钟延旭, 梁玉裕, 刘展华, 等. 一起农民工误食断肠草泡制酒引起中毒死亡事件调查分析[J]. 应用预防医学, 2016, 22(2): 141–142.
- Zhong YX, Liang YY, Liu ZH, *et al.* Investigation and analysis of a fatal

poisoning event caused by peasant workers' misseating of broken intestine straw to make wine [J]. Appl Prev Med, 2016, 22(2): 141–142.

(责任编辑: 武英华)

作者简介

罗达龙, 副主任药师, 主要研究方向为食品、药品质量与安全。

E-mail: 364634386@qq.com

钟家良, 主要研究方向为食品、药品质量与安全。

E-mail: 136014396@qq.com