

超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法测定珠芽瓜叶乌头中毒患者血液、尿液中乌头生物碱及其代谢产物

张志清, 伍福仙, 林 佶*

(云南省疾病预防控制中心, 昆明 650032)

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法(ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry, UPLC/Q-TOF-MS)定性定量检测珠芽瓜叶乌头中毒患者血液、尿液中乌头生物碱及其相关代谢产物。**方法** 血样经离心后, 取上层血清稀释后过 0.22 μm 微孔滤膜;尿样经稀释后过 0.22 μm 微孔滤膜。食物经前处理后, 过 Oasis MCX 60 mg/3 mL 固相萃取小柱, 洗脱、吹干、定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜。草乌块根经匀浆、超声、离心后, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜。所有样品溶液经 Aglient SB-C₁₈ 色谱柱分离后用 UPLC-Q-TOF 进行测定。**结果** 14 种乌头类生物碱及其代谢产物在 1.0~100 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.99, 检出限在 0.1~5.0 ng/mL 之间, 样品加标回收率为 78.9%~116.9%, 相对标准偏差为 0.5%~4.1%($n=6$)。2 位患者血液中检出苯甲酰乌头原碱、滇乌头碱和草乌甲素, 其中苯甲酰乌头原碱未达到定量限, 滇乌头碱含量分别为 0.18 和 0.27 mg/L, 草乌甲素含量分别为 0.25 和 0.62 mg/L; 2 位患者尿液中检出苯甲酰乌头原碱、滇乌头碱、草乌甲素, 苯甲酰乌头原碱含量分别为 0.063 和 0.055 mg/L, 滇乌头碱含量分别为 1.66 和 3.79 mg/L 草乌甲素含量分别为 2.31 和 4.89 mg/L, 其中一份尿样检出印乌头碱, 含量为 0.159 mg/L。**结论** 此方法操作简便、准确度好、能够快速检测检材中乌头类生物碱。珠芽瓜叶乌头含有较高的滇乌头碱和草乌甲素, 尿液中乌头生物碱及代谢产物高于血液中产物含量, 更适合作为检验材料。

关键词: 珠芽瓜叶乌头; 草乌甲素; 滇乌头碱; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法; 血液; 尿液

Determination of aconitum alkaloids and its metabolites in blood and urine of patient with *Aconitum hemsleyanum* var. *hsiae* poisoning by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry

ZHANG Zhi-Qing, WU Fu-Xian, LIN Ji*

(Center for Disease Control and Prevention of Yunnan, Kunming 650032, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for qualitative and quantitative detection of aconitum alkaloids and

基金项目: 云南省卫生科技计划项目(2018NS0229)

Fund: Supported by Yunnan Health Technology Project (2018NS0229)

*通讯作者: 林佶, 主任技师, 主要研究方向为生物毒素与食品安全。E-mail: linji666@163.com

*Corresponding author: LIN Ji, Chief Technician, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China. E-mail: linji666@163.com

their metabolites in urine and blood of patients with *Aconitum hemisleyanum* var. *hsiae* poisoning by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS). **Methods** After centrifugation of the blood sample, the upper serum was diluted and passed through a 0.22 μm microporous membrane. The urine sample was diluted and filtered with 0.22 μm microporous membrane. The food samples were eluted, dried and fixed volume on a solid-phase extraction column of Oasis MCX 60 mg/3 mL after pretreatment and passed through a 0.22 μm microporous membrane. Aconite roots were homogenized, sonicated, and centrifuged, then the supernatant was filtered with a 0.22 μm microporous membrane. All the sample solutions were separated on an Agilent SB-C₁₈ column and determined by UPLC-Q-TOF. **Results** The linear relationship of 14 aconitoid alkaloids and their metabolites were good in the concentration range of 1.0-100 ng/mL, with all correlation coefficients greater than 0.99, and the detection limit was 0.1-5.0 ng/mL. The recoveries of standard addition were 78.9%-116.9% with the relative standard deviation 0.5%-4.1% ($n=6$). Benzoylaconitine, yunaconitine and bulleyaconitine A were detected in the blood of 2 patients, among which the content of benzoylaconitine did not reach the quantitative limit, yunaconitine content was 0.18 and 0.27 mg/L, and bulleyaconitine A content was 0.25 and 0.62 mg/L respectively. Benzoylaconitine, yunaconitine and bulleyaconitine A were detected in the urine of 2 patients. The content of benzoylaconitine was 0.063 and 0.055 mg/L, the content of yunaconitine was 1.66 and 3.79 mg/L, and the content of bulleyaconitine A was 2.31 and 4.89 mg/L respectively. Indaconitine was found in one urine sample, with the content of 0.159 mg/L. **Conclusion** This method is simple, accurate and can be used to detect aconitine alkaloids in samples. *Aconitum hemisleyanum* var. *hsiae* contains extremely high bulleyaconitine A and yunaconitine, and urine contains a higher content of aconitine alkaloid and its metabolites than those in the blood, which is more suitable to be used as the test material.

KEY WORDS: *Aconitum hemisleyanum* var. *hsiae*; bulleyaconitine A; yunaconitine; ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry; blood; urine

1 引 言

乌头属 (*Aconitum* L.) 植物属于毛茛科 (Ranunculaceae), 中国约有 200 多种, 其中云南乌头属植物有 66 种, 主要分布在滇西北, 约占全国的 31.7%。珠芽瓜叶乌头 (*Aconitum hemisleyanum* var. *hsiae*) 产地西藏东南部 (错那), 生山地草坡^[1]。野外采样时发现在云南省红河、楚雄、文山也有野生群居分布。《药性论》云草乌“味苦辛, 大热, 有大毒”具有回阳救逆、散寒止痛之效^[2], 常用于风寒湿痹、肢体疼痛、麻木拘挛、心腹冷痛等的治疗。乌头属植物中所含生物碱包括单酯型、双酯型、胺醇型以及其他类型, 双酯型生物碱为乌头属植物的主要毒性成分, 而单酯型和胺醇型生物碱毒性分别仅为其的 1/5~1/10 和 1/2000~1/4000^[3]。乌头属植物主要药用成分为二萜类生物碱, 具有镇痛、局麻、抗炎、杀虫等药理活性, 已有高乌甲素、草乌甲素等作为药品应用于临床^[4]。但该物有一定毒性, 主要表现为心肌毒性、神经毒性^[5]。云南省部分地区民间传统中有食用炖煮乌头类植物块根 (如草乌、川乌、附子等) 或饮用乌头泡制药酒保健的习惯^[6], 由于炮制、个体差异等原因引起的乌头碱中毒甚至死亡的案例很多^[7],

口服乌头碱 0.2 mg 即可引起中毒, 3~5 g 即可致人死亡^[8], 据中国疾病预防控制中心突发公共卫生事件管理信息系统得知, 2007~2017 年云南省共报告 34 起乌头中毒事件, 累计 351 例中毒, 47 例死亡, 死亡率为 13.39%^[9], 可见对乌头生物碱及其代谢产物进行准确的测定具有重要的意义。

目前用高效液相色谱法^[10,11]和色谱串联质谱法^[12]测定草乌及其他生物检材中的乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的报道较多, 大多是以北草乌为基源植物的草乌^[13], 其主要毒性成分为乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等, 而关于以黄草乌或滇南草乌为基源的云南乌头属植物中主要的毒性成分滇乌碱和草乌甲素等的研究较少^[14,15]。在针对乌头中毒案件的检测中多以乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等为乌头中毒的主要检测指标, 缺乏对滇乌头碱和草乌甲素等其他乌头类生物碱的检测。

本研究利用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法 (ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry, UPLC/Q-TOF-MS) 对珠芽瓜叶乌头中毒患者血液、尿液中多种乌头生物碱及其相关代谢产物进行定性和定量测定, 比较血液中的和尿液中代谢产物含量, 以期为临床快速诊断和治疗乌头中毒患者提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验仪器

Agilent G6550 型型超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱仪、Mass Hunter 6.0 工作站、Buchi 旋转蒸发仪(美国安捷伦公司); Nanopure 纯水机(美国 Barnstead 公司); FLUCA 匀浆机、3-18K 大容量高速离心机(美国 Sigma 公司); 天平($d=0.1\text{ mg}$ 美国丹佛仪器公司)。

2.1.2 实验试剂

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲酸、乙酸铵(纯度均大于 90%, 美国 SIGMA-ALDRICH 公司); 盐酸(优级纯, 西陇化工公司); 氨水(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 生物碱标准品: 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、印乌头碱、滇乌碱、宋果灵、草乌甲素、10-羟基乌头碱、代谢产物标准品: 苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头原碱、次乌头原碱、乌头原碱(纯度大于 98%,成都曼思特生物科技有限公司)。

2.1.3 样品来源

云南省某县送检的样品: 中毒患者郭某和王某的血样、尿样及草乌炖猪脚和珠芽瓜叶乌头(经鉴定证实为珠芽瓜叶乌头)块根。

2.2 实验方法

2.2.1 样品预处理

取患者血液入 10 mL 离心管以 3000 r/min 离心 5 min, 取上层血清 0.5 mL, 用流动相定容至 1.0 mL, 过 0.22 μm 滤膜至微量进样瓶待测。

取患者尿液 0.5 mL, 用流动相定容至 1.0 mL, 过 0.22 μm 滤膜至微量进样瓶待测。

取食物中猪脚肉 5.0 g, 加 25 mL 0.1 mol/L HCl 混匀,

8000 r/min 离心 20 min。取 15 mL 过 Oasis MCX 60 mg/3 mL 固相萃取小柱(使用前用 1 mL 甲醇和 1 mL 纯水活化), 控制流速为 1 mL/min, 用 5 mL 0.1 mol/LHCl 和 5 mL 甲醇淋洗, 用含 0.5%氨水的甲醇 20 mL 洗脱, 收集洗脱液, 氮吹至近干, 用乙腈-10 mmol/L 乙酸铵(50:50, V/V)定容至 2.0 mL, 过 0.22 μm 滤膜至微量进样瓶待测。

称取草乌块根 2.0 g, 加入 10 mL 甲醇匀浆后, 超声 10 min, 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液 1.0 mL 稀释 10 倍过 0.22 μm 滤膜至微量自动进样瓶中。

2.2.2 色谱条件

色谱柱: Aglient SB-C₁₈(2.1 mm×50 mm, 2.7 μm); 进样量 2 μL ; 柱温为 55 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$; 流动相 A 为 5 mmol/乙酸铵+0.1%甲酸水, B 为乙腈; 液相色谱流动相梯度洗脱程序见表 1^[16]。

表 1 梯度洗脱程序		
Table 1 Liquid chromatography mobile phase gradient elution procedure		
时间/min	A/%	B/%
0.0	90	10
1.0	90	10
8.0	5	95
10.0	5	95
10.1	10	10

2.2.3 质谱条件

采用 Dual AJS 电喷雾电离正离子 (positive electrospray ionization, ESI⁺)模式, 毛细管电流:4.352 μA ;毛细管电压:4.0 kV; 雾化器温度:250 $^{\circ}\text{C}$; 雾化器压: 35 psi; 干燥气流速: 13.0 L/min; 鞘流气流速: 12.0 L/min; 鞘流气温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 参比离子为 m/z 121.050873、 m/z 922.009798, 扫描范围为 m/z 70~1400。14 种标准物质的特征谱库如表 2^[16]。

表 2 14 种标准化化合物的特征谱库参数
Table 2 Characteristic library parameters of 14 standard compounds

化合物	分子式	保留时间/min	相对分子质量	碰撞能量/V	碎片离子(m/z)
乌头碱	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₁	4.737	645.3149	40	586.3014, 105.0342
新乌头碱	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	4.420	631.2993	40	572.2858, 105.0337
次乌头碱	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀	4.574	615.3043	40	556.2899, 105.0344
苯甲酰乌头原碱	C ₃₂ H ₄₅ NO ₁₀	3.888	603.3043	60	544.2757, 105.0335
苯甲酰新乌头原碱	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	3.661	589.2887	60	540.2595, 105.0335
苯甲酰次乌头原碱	C ₃₁ H ₄₃ NO ₉	4.034	573.2938	60	542.2747, 105.0335
乌头原碱	C ₂₅ H ₄₁ NO ₉	1.731	499.2781	40	450.2490, 58.0652
新乌头原碱	C ₂₄ H ₃₉ NO ₉	1.130	485.2625	40	436.2321, 75.0442
次乌头原碱	C ₂₄ H ₃₉ NO ₈	2.181	469.2676	40	438.2488, 94.0650
宋果灵	C ₂₂ H ₃₁ NO ₃	1.666	357.2304	40	340.2274, 58.0653
滇乌头碱	C ₃₅ H ₄₉ NO ₁₁	4.548	659.3306	40	600.3164, 135.0445
印乌头碱	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₀	4.481	629.3200	40	570.3063, 105.0333
草乌甲素	C ₃₅ H ₄₉ NO ₉	5.149	627.3407	40	568.3273, 135.0438
10-羟基乌头碱	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₂	4.454	661.3098	40	602.2954, 105.0332

2.2.4 定性检测

采用 Agilent MassHunter 定性分析软件 B.0 6.00 版本对正离子模式下的质谱原始数据进行分析, 如果检出的色谱峰的分子量、保留时间与标准特征谱库相一致, 则可判定样品中存在该物质。

2.2.5 定量检测

采用 Agilent Mass Hunter 定量分析软件 B.06.00 版本进行定量。

2.2.6 标准曲线的绘制

准确称取每种标准品各 5.0 mg, 用乙腈溶解并在 5.0 mL 容量瓶中定容至刻度。用乙腈-0.01 mol/L 乙酸铵 (50:50, V:V) 逐级稀释成 1.0 µg/mL, 于 -20 °C 保存储备。使用时, 用乙腈-5 mmol/L 乙酸铵 (50:50, V:V) 将 14 种生物碱配制成 10、20、40、60、80、100 ng/mL 的标准系列, 进行测定, 以浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。

3 结果与分析

3.1.1 质谱条件优化

根据 14 种乌头碱的分子结构特征, 选用 ESI 正离子模式进行实验, 用针泵以 5.0 µL/min 恒定体积流量注射标准品, 在 Q-TOF 模式下, 逐个微调雾化气(Gas1)、辅助加热气(Gas2)、气帘气、喷雾电压、离子源温度及喷雾针位置等离子源参数, 以使总离子流的响应值达到最佳。

3.1.2 色谱条件优化

使用常规液相色谱柱 C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 µm) 进行分离测定, 出峰时间在 6~9 min, 且峰型较宽, 采用 glient SB C1s(2.1 mm×50 mm, 1.8 µm) 既能较好地分离 14 种乌头碱, 且出峰时间缩短 3.5~4.0 min, 节省了检出时间。

3.2 方法学验证

3.2.1 方法线性范围、检出限与定量限

在 1.0~100 mL 的线性范围内, 14 种乌头生物碱的线性方程、相关系数、检出限和定量限见表 3。相关系数均大于 0.99, 线性关系较好。将各生物碱标准溶液线性范围的最低浓度点稀释并进样, 以 3 倍噪声计算检出限为 0.1~5.0 ng/mL, 以 10 倍噪声计算定量限为 0.5~10 ng/mL, 方法灵敏度高。

3.2.2 回收率与精密度

取血液、尿液、草乌炖猪脚、草乌块根样品各 2 份, 分别进行低浓度(20 ng/mL)、高浓度(80 ng/mL) 2 种不同浓度的加标实验, 每个浓度重复 6 次, 计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 结果见表 4~6。血液平均回收率为 82.1%~112.2%, 尿液平均回收率为 81.4%~114.3%, 食物平均回收率为 78.9%~116.9%。各样品的提取回收率均高于 75%, 相对标准偏差为 0.5%~4.1%, 方法准确性好, 满足研究的需要。

表 3 14 种乌头生物碱的线性方程、相关系数和检出限
Table 3 Linear equations, correlation coefficients and detection limits of 14 aconitum alkaloids and their metabolites

分析物	线性方程	相关系数 r^2	检出限/(ng/mL)	定量限/(ng/mL)
乌头碱	$Y=99181X+254212$	0.9979	0.1	0.5
新乌头碱	$Y=217852X+1274058$	0.9947	0.2	1.0
次乌头碱	$Y=62305X+30925$	0.9949	0.1	0.5
苯甲酰乌头原碱	$Y=5288212X-496508$	0.9979	0.1	0.5
苯甲酰新乌头原碱	$Y=138614X+519776$	0.99597	0.1	0.5
苯甲酰次乌头原碱	$Y=75502X+226167$	0.9962	0.1	0.5
乌头原碱	$Y=506226X-985718$	0.997	0.1	0.5
新乌头原碱	$Y=454867X-489550$	0.9992	0.2	1.0
次乌头原碱	$Y=134993X-445640$	0.9972	0.1	0.5
宋果灵	$Y=224723X+455291$	0.9978	0.1	0.5
滇乌头碱	$Y=72930X+324675$	0.9959	0.1	0.5
印乌头碱	$Y=92115X+374110$	0.9962	0.1	0.5
草乌甲素	$Y=1557X+5473$	0.9966	5.0	10.0
10-羟基乌头碱	$Y=10017X+36544$	0.9662	0.5	1.0

表 4 血液中的回收率和精密度(n=6)
Table 4 Recoveries and precisions of the method in blood(n=6)

分析物	加标量/(ng/mL)	RSD/%	平均回收率/%	加标量/(ng/ml)	RSD/%	平均回收率/%
乌头碱	20	0.7	102.6	80	0.9	101.2
新乌头碱	20	0.9	101.6	80	1.1	97.5
次乌头碱	20	2.6	89.8	80	1.6	94.1
苯甲酰乌头原碱	20	1.5	82.1	80	1.3	88.8
苯甲酰新乌头原碱	20	3.1	93.3	80	0.5	87.6
苯甲酰次乌头原碱	20	2.6	110.9	80	1.6	106.1
乌头原碱	20	0.7	103.0	80	1.5	98.5
新乌头原碱	20	4.1	112.2	80	1.9	91.2
次乌头原碱	20	0.9	96.6	80	1.0	91.1
宋果灵	20	1.6	112.1	80	1.3	92.8
滇乌头碱	20	1.3	85.2	80	1.2	86.6
印乌头碱	20	1.1	90.1	80	1.6	96.0
草乌甲素	20	3.3	82.3	80	1.7	95.9
10-羟基乌头碱	20	3.2	100.5	80	2.8	91.9

表 5 尿液中回收率和精密度(n=6)
Table 5 Recoveries and precisions of the method in urine (n=6)

分析物	加标量/(ng/mL)	RSD/%	平均回收率/%	加标量/(ng/mL)	RSD/%	平均回收率/%
乌头碱	20	0.6	98.2	80	1.5	93.5
新乌头碱	20	1.1	101.7	80	1.1	92.9
次乌头碱	20	1.8	89.6	80	2.2	81.7
苯甲酰乌头原碱	20	0.9	91.2	80	0.9	96.7
苯甲酰新乌头原碱	20	2.3	95.6	80	2.1	86.8
苯甲酰次乌头原碱	20	2.9	110.7	80	1.6	109.2
乌头原碱	20	0.9	101.1	80	1.2	96.1
新乌头原碱	20	3.1	114.3	80	2.4	88.9
次乌头原碱	20	0.8	89.9	80	0.7	94.1
宋果灵	20	0.9	106.1	80	1.3	93.6
滇乌头碱	20	1.2	85.3	80	1.2	84.6
印乌头碱	20	1.1	81.4	80	1.9	91.3
草乌甲素	20	2.9	89.8	80	1.1	91.9
10-羟基乌头碱	20	1.8	101.3	80	2.4	87.3

表 6 食物中回收率和精密度(n=6)
Table 6 Recoveries and precisions of the method in food(n=6)

分析物	加标量/(ng/ml)	RSD/%	平均回收率/%	加标量/(ng/ml)	RSD/%	平均回收率/%
乌头碱	20	1.1	103.4	80	1.1	101.2
新乌头碱	20	1.2	89.8	80	0.9	86.3
次乌头碱	20	2.6	92.1	80	1.5	82.7
苯甲酰乌头原碱	20	2.5	78.9	80	1.3	86.1
苯甲酰新乌头原碱	20	2.9	94.5	80	0.6	82.8
苯甲酰次乌头原碱	20	2.3	109.1	80	1.6	106.9
乌头原碱	20	0.9	102.1	80	1.3	96.1
新乌头原碱	20	3.6	116.9	80	2.6	89.9
次乌头原碱	20	0.9	93.4	80	0.9	90.1
宋果灵	20	1.4	104.9	80	1.3	101.2
滇乌头碱	20	0.9	98.7	80	1.2	83.6
印乌头碱	20	1.3	81.3	80	1.3	96.3
草乌甲素	20	3.1	93.3	80	2.3	93.9
10-羟基乌头碱	20	2.9	106.5	80	2.6	89.6

3.2.3 一级质谱参数的选择

一级质谱定性通过化合物的精确质量数和质量偏差的匹配来筛查确证。选择建好的特征谱库,以精确质量数和保留时间为主的搜索模式,调整质量偏差(5 mg/L)和保留时间偏差(0.1 min)。在比对[M+H]⁺、[M+Na]⁺、[M+K]⁺等几种母离子的加和状态,选择[M+H]⁺作为母离子。在积分器选择中,使用 Agilent 积分器。其他参数默认不变。应用以上设置对 14 种目标化合物进行一级筛查,能够完全找到全部化合物,且峰型最好,证明以上参数为最优参数,得到一级质谱图。

3.2.4 二级质谱参数的选择

选择以精确质量数为主的搜索模式,质量偏差为 5 ppm,选中 MS/MS 积分器和建好的特征谱库。在分子式设置中,为满足目标化合物的分子组成,添加 C、H、O、N 元素,并通过调整元素个数范围尽可能缩小分子式的组成范围,提高准确度。其他参数默认不变。应用以上设置,先发现全部可能的化合物,在确证化合物,得到的二级筛查结果发现全部 14 种目标化合物都能够确证,证明以上参数为最优参数。

提取 20、40、60 V 碰撞能量下的二级质谱图,选取母离子相对丰度较低、碎片离子相对丰度较高并且干扰少的作为定性离子,而相对应的电压则为最优碰撞电压。

同时,将特征碎片离子、保留时间、二级质谱图等信息导入特征谱库,得到 14 种目标化合物最优碰撞电压下的二级质谱图。

3.3 实际样品检测

血样、尿样、食物和草乌块根的详细检测结果见表 7。离子流色谱图如图 1,质谱图如图 2(血样和尿样以王某为例)

4 结论与讨论

本研究对珠芽瓜叶乌头及其中毒患者的血液、尿液进行了定性定量的测定。在乌头块根检出了乌头碱,而在炖煮的食物中未检出,可能是由于乌头碱在烹煮加热的过程中,大部分水解为苯甲酰乌头原碱^[17],建议在检测烹饪食物中乌头类生物碱时加入苯甲酰乌头原碱的检测。患者尿液中草乌甲素、滇乌头碱、苯甲酰乌头原碱的含量较高,而血液含量远远低于尿液,可能是由于乌头碱的血浆蛋白结合率低^[18](23.9%~31.9%),使其很快从血浆中消除;也有文献报道^[19]乌头类生物碱在体内代谢迅速,短时间内血药浓度迅速下降,中毒 1 天后就不能检出,而在尿液中甚至中毒的第 7 天还能检出^[20],结果说明相比血液,以中毒患者的尿液作为乌头类生物碱的检材是更好的选择。

表 7 样品中分析物检出情况及含量
Table 7 Detection and content of compound in samples

分析物	1 号血液/(mg/L)	1 号尿液/(mg/L)	2 号血液/(mg/L)	2 号尿液/(mg/L)	食物/(mg/kg)	草乌块根/(mg/kg)
乌头碱	--	--	--	--	--	2.57
新乌头碱	--	--	--	--	--	--
次乌头碱	--	--	--	--	检出*	--
苯甲酰乌头原碱	检出*	0.063	检出*	0.055	0.89	--
苯甲酰新乌头原碱	--	--	--	--	--	--
苯甲酰次乌头原碱	--	--	--	--	--	--
乌头原碱	--	--	--	--	--	--
新乌头原碱	--	--	--	--	--	--
次乌头原碱	--	--	--	--	--	--
宋果灵	--	--	--	--	--	--
滇乌头碱	0.18	1.66	0.27	3.79	15.42	45.27
印乌头碱	--	--	--	0.159	2.23	6.7
草乌甲素	0.25	2.31	0.62	4.89	50.8	137.3
10-羟基乌头碱	--	--	--	--	--	--

注: *为低于定量限 --为未检出

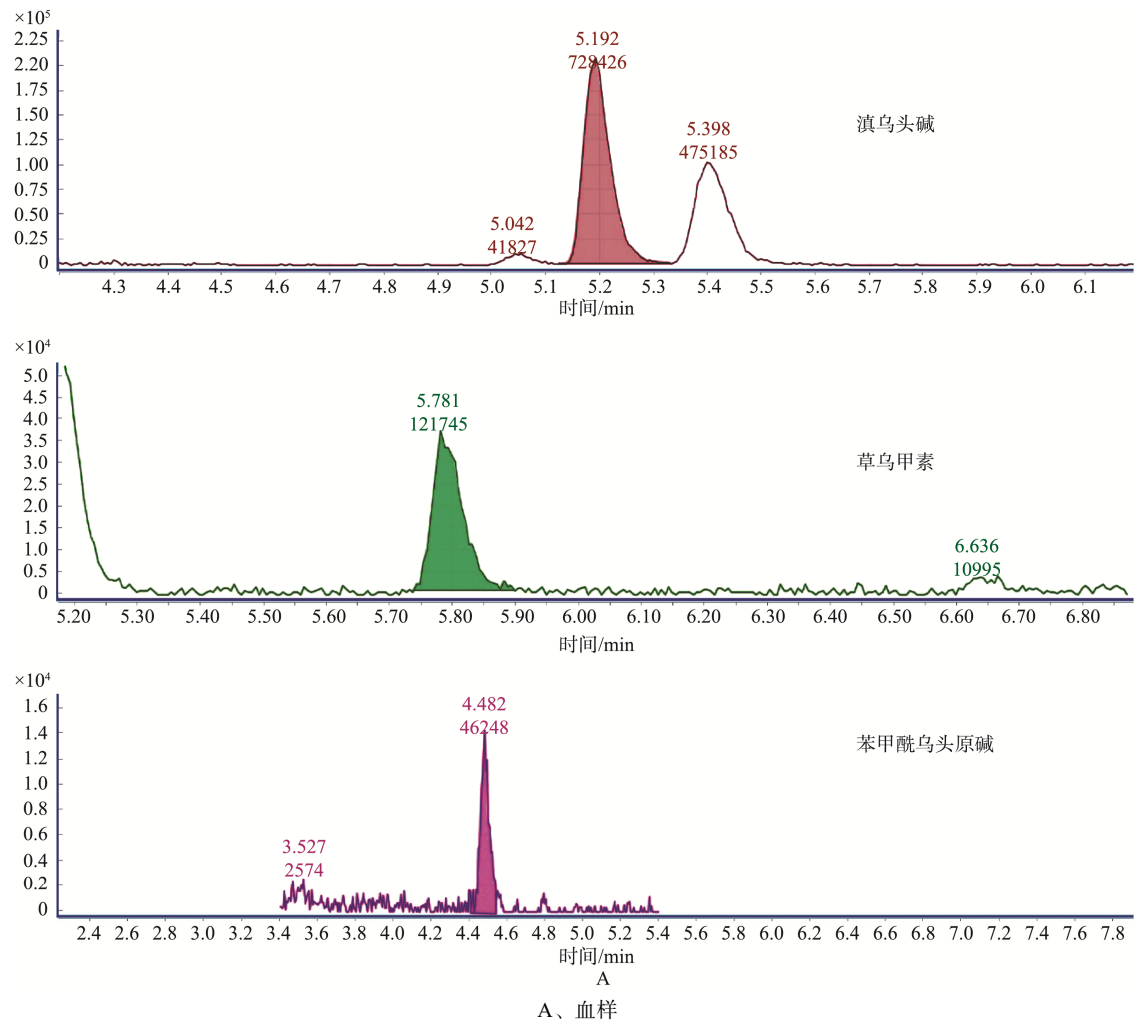
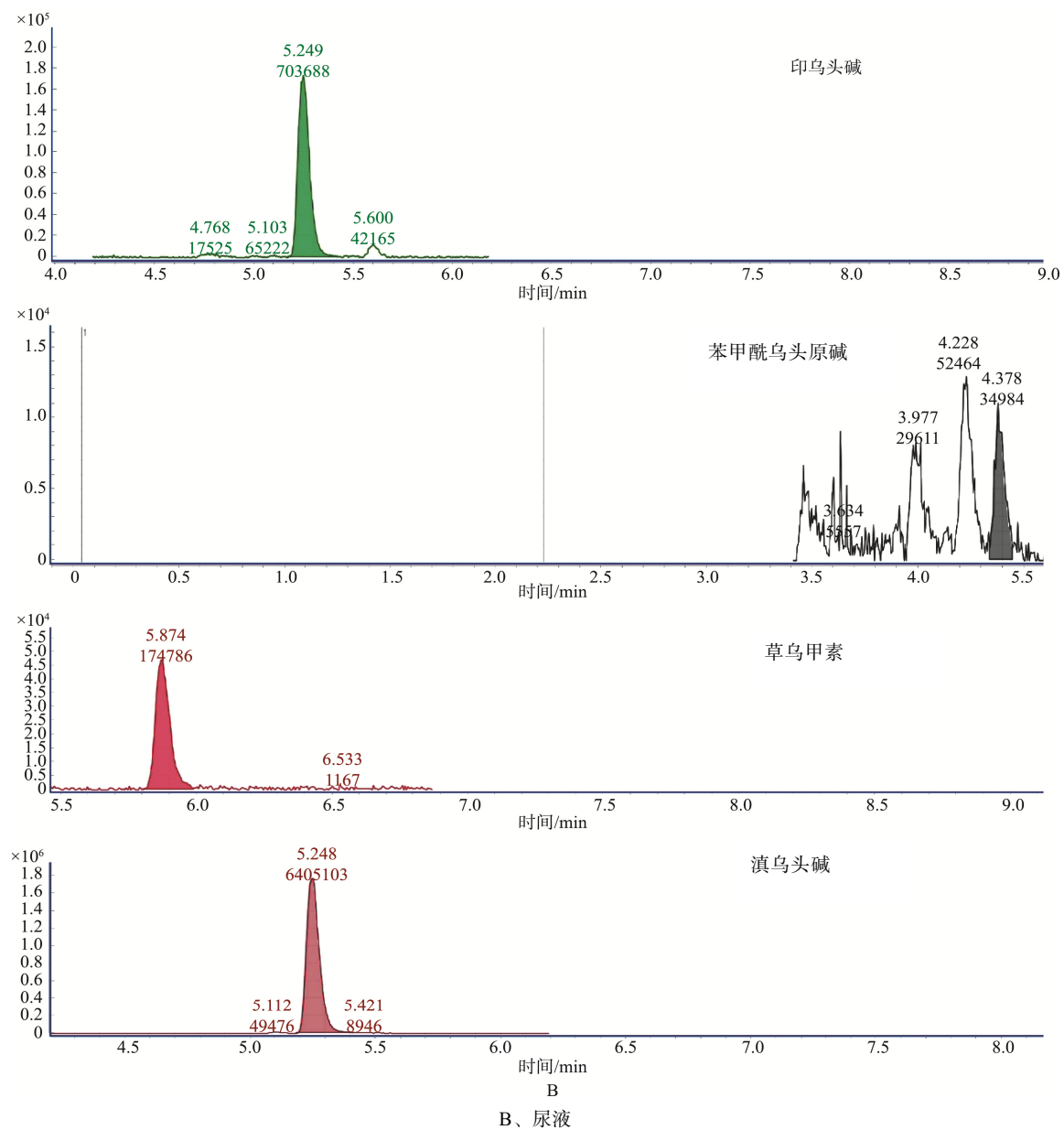


图 1 样品中乌头类生物碱的总离子流色谱图
Fig.1 Total ion flow chromatogram of aconitum alkaloids in sample.



续图 1 样品中乌头类生物碱的总离子流色谱图
Fig.1 Total ion flow chromatogram of aconitum alkaloids in sample.

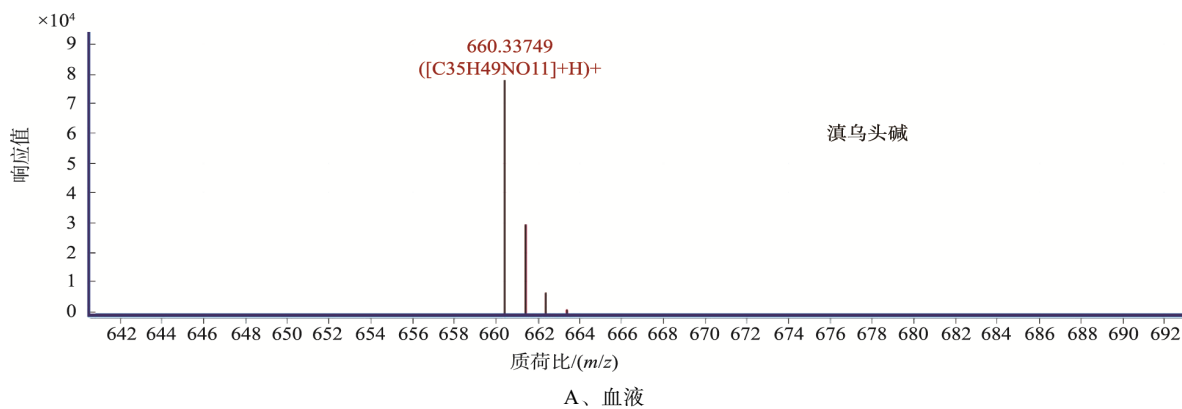
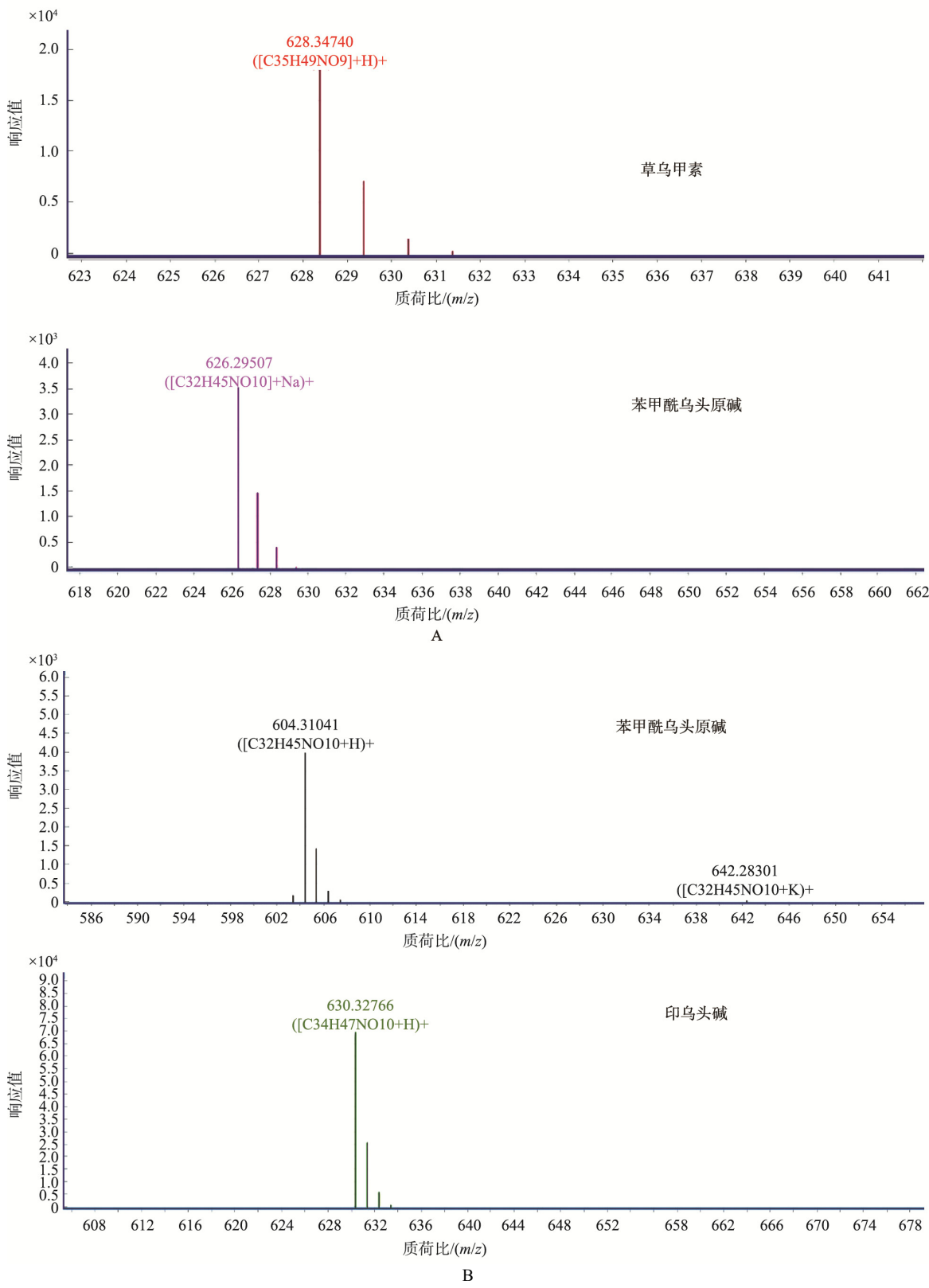


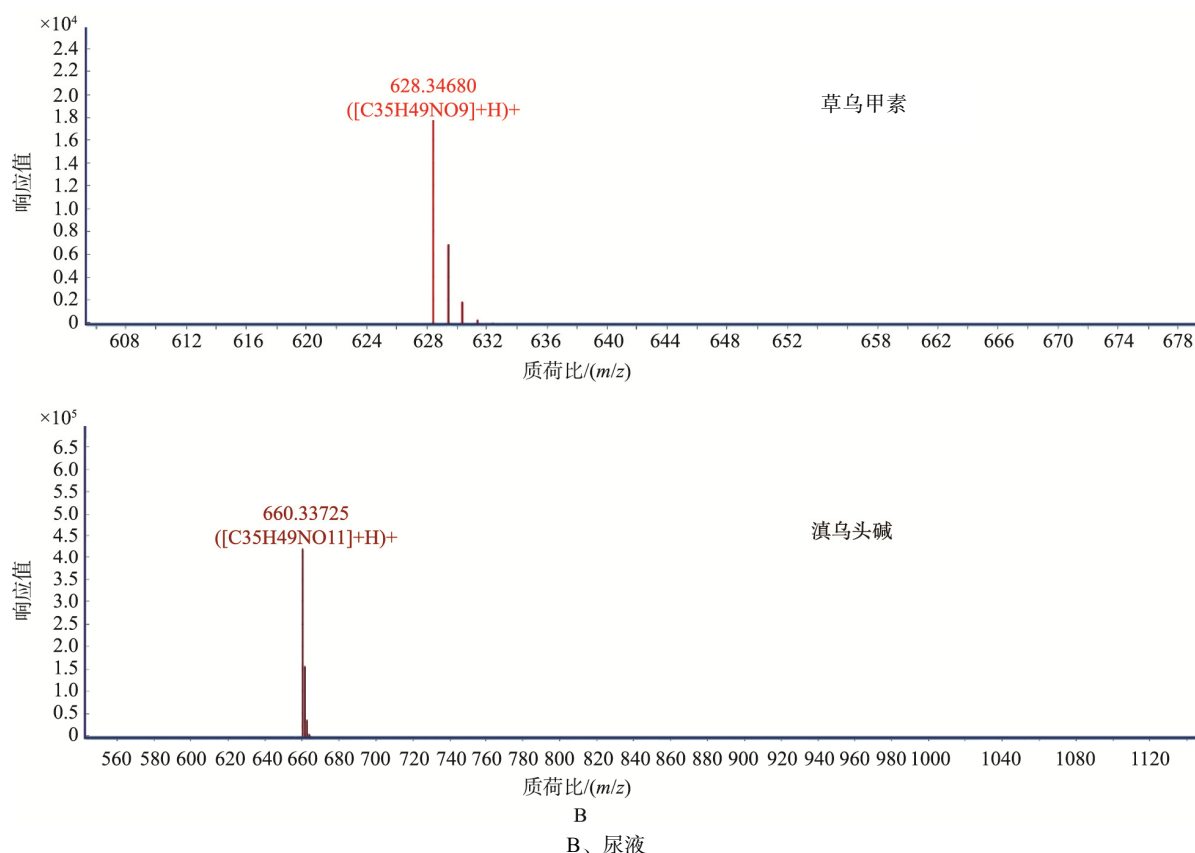
图 2 样品中乌头类生物碱的质谱图
Fig.2 The mass spectrogram of aconitum alkaloids in sample



A、血液、B、尿液

续图 2 样品中乌头类生物碱的质谱图

Fig.2 The mass spectrogram of aconitum alkaloids in sample



续图 2 样品中乌头类生物碱的质谱图

Fig.2 The mass spectrogram of aconitum alkaloids in sample

参考文献

- [1] 王文采. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
Wang WC. Flora of China [M]. Beijing: Science Press, 1979.
- [2] 韩旭侯, 侯娅婕. 乌头碱药理作用及毒性研究进展[J]. 中国处方药, 2014, 12(12): 149-150.
Han XH, Hou YJ. Research progress on pharmacological effects and toxicity of aconitine [J]. J Chin Prescr Drug, 2014, 12 (12): 149-50.
- [3] 李谦, 过立农, 郑健, 等. 乌头属药用植物的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(7): 1129-1149.
Li Q, Guo LN, Zheng J, et al. Research progress on aconite medicinal plants [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(7): 1129-1149.
- [4] 艾嫦, 朱妍妍, 赵长琦. 乌头属植物化学成分、药理作用及其内生菌的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(2): 248-259.
Ai C, Zhu YY, Zhao CQ. Research progress on chemical constituents, pharmacological actions and endophytes of aconitum [J]. Res Dev Nat Prod, 2012, 24(2): 248.
- [5] 刘帅, 李妍, 李卫飞, 等. 乌头类中药毒性及现代毒理学研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(22): 4095-4102.
Liu S, Li Y, Li WF, et al. Research progress of toxicity and modern toxicology of aconitum Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2016, 47(22): 4095-4102.
- [6] 丁劲峰, 宋祥和, 季阳, 等. 乌头类生物碱体内代谢机理研究进展[J]. 中国法医学杂志, 2019, 34(4): 375-378.
- [7] 郑冬律. 急性乌头碱中毒死亡 1 例[J]. 中国法医学杂志, 2018, 33(6): 651, 654, 671.
Zheng DL. A case of death from acute aconitine poisoning [J]. Chin J Forensic Med, 2018, 33(6): 651, 654, 671.
- [8] 张孟. 1 例乌头碱中毒导致恶性心律失常的护理[J]. 饮食保健, 2017, (12): 140.
Zhang M. Nursing of arrhythmia caused by aconitine poisoning [J]. Food Health Care, 2017, (12): 140.
- [9] 郭卉, 林燕, 李真晖, 等. 云南省 2007~2017 年乌头中毒事件特征分析[J]. 华南预防医学, 2018, 44(4): 375-377.
Guo H, Lin Y, Li ZH, et al. Analysis of the characteristics of aconite poisoning in Yunnan province from 2007 to 2017 [J]. South Chin Prev Med, 2018, 44(4): 375-377.
- [10] 林佑, 杨艳国, 张昆仑, 等. HPLC 快速测定草乌中毒患者尿液中的乌头碱、次乌头碱、新乌头碱[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(4): 486-487, 490.
Lin J, Yang YG, Zhang KL, et al. Rapid determination of aconitine, hypoconitine, and aconitine in the urine of patients with Caowu poisoning by HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol, 2016, 26(4): 486-487, 490.
- [11] 杨正明, 威则日沙, 李学学, 等. 基于多元统计分析的川产道地药材江油附子和川乌中 6 种生物碱含量比较研究[J]. 中草药, 2019, 50(6):

- 1461–1471.
- Yang ZM, Wei ZRS, Li XX, *et al.* Comparative study on the contents of 6 kinds of alkaloids in *Rhizoma aconiti* Lateralis and Chuanwu based on multivariate statistical analysis [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2019, 50(6): 1461–1471.
- [12] 肖日平. 基于 UPLC-MS/MS 的附子中六种生物碱含量分析及药代动力学研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- Xiao RP. Analysis and pharmacokinetics of six alkaloids in aconite based on UPLC-MS/MS [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2014.
- [13] 李继印, 张瑞林, 方平, 等. 液相色谱-质谱法测定云南草乌中双酯型生物碱的含量[J]. *昆明医科大学学报*, 2015, 36(10): 5–8.
- Li JY, Zhang RL, Fang P, *et al.* Determination of diester alkaloids in Caowu Yunnan by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Kunming Med Univ*, 2015, 36(10): 5–8.
- [14] 海青山, 马晓霞, 杨榆青, 等. 滇西乌头中三种二萜生物碱相关药效和毒性的对比[J]. *昆明医科大学学报*, 2017, 38(1): 18–22.
- Hai QS, Ma XX, Yang YQ, *et al.* Comparison of efficacy and toxicity of three diterpenoid alkaloids in aconite from western Yunnan [J]. *J Kunming Med Univ*, 2017, 38(1): 18–22.
- [15] 李继印, 洪仕君, 黄舒柏清, 等. UPLC-MS/MS 法检测黄草乌中毒人体肝脏中的主要生物碱成分[J]. *河南科技大学学报(医学版)*, 2017, 35(4): 306–309.
- Li JY, Hong SJ, Huang SBQ, *et al.* UPLC-MS/MS detection of main alkaloids in human liver poisoned by Huangcaowu [J]. *J Henan Univ Sci Technol (Med Ed)*, 2017, 35(4): 306–309.
- [16] 伍福仙, 张志清, 王瑾, 等. 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱法快速测定草乌中毒患者血清中的乌头类生物碱及其代谢产物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(22): 7486–7493.
- Wu FX, Zhang ZQ, Wang J. Rapid determination of aconitoid alkaloids and their metabolites in blood serum samples of patients with aconitum poisoning by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(22): 7486–7493.
- [17] 付玲, 戴丽莉, 赵翡翠. 新疆准噶尔乌头中乌头碱及脱氧乌头碱水解机制研究[J]. *中草药*, 2018, 49(24): 5794–5802.
- Fu L, Dai LL, Zhao FC, *et al.* Study on the hydrolytic mechanism of aconitine and deoxyaconitine in the aconitum of Jungar in Xinjiang [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2018, 49(24): 5794–5802.
- [18] Tang L, Gong Y, Lv C, *et al.* Pharmacokinetics of aconitine as the targeted marker of Fuzi (*Aconitum carmichaeli*) following single and multiple oral administrations of Fuzi extracts in rat by UPLC/MS/MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(2): 736–741.
- [19] 陶长戈, 李文军, 彭成. 乌头碱在大鼠体内的毒代动力学研究[J]. *湖北中医药大学学报*, 2011, 13(3): 21–23.
- Tao CG, Li WJ, Peng C. Study on the toxicokinetics of aconitine in rats [J]. *J Hubei Univ Tradit Chin Med*, 2011, 13(3): 21–23.
- [20] Hayashida M, Hayakawa H, Wada K. A column-switching LC/MS/ESI method for detecting tetrodotoxin and aconitum alkaloids in serum [J]. *Legal Med*, 2003, 5(5): 101–104.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



张志清, 硕士, 主要研究方向为植物毒素及食品安全检测。
E-mail: 254657957@qq.com



林 佶, 主任技师, 主要研究方向为植物毒素及食品安全检测。
E-mail: linji666@163.com