

# 高效液相色谱法测定大鼠组织中乌头碱的含量

李文东, 马 辰\*

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定口服乌头碱后大鼠组织中的含量。方法: 采用 Waters 2690-996PAD 色谱系统。色谱条件: 用 HAILSIL 100 C<sub>18</sub>(5 μm, 250 mm × 4.6 mm), 流动相为甲醇: 水: 二乙胺(75: 25: 0.1), 流速 0.9 mL/min, 检测波长 240 nm。脏器样品按重量体积比(1: 5)加入 1.0 mmol/L HCl, 匀浆离心取上清液, 冷冻干燥, 有机溶剂提取, 减压蒸干, 用适量甲醇溶解残渣, 30 μL 进样。结果: 大鼠脏器心、肝、脾、肺、肾均检测出乌头碱, 脑与脊髓中未检出。心、脾、肺、肾线性范围为 8.0 ng~ 2.0 μg, 相关系数(*r*)分别为 0.997 2, 0.998 6, 0.999 3, 0.999 4; 肝脏线性范围为 0.04 μg~ 4.0 μg, 相关系数(*r*)为 0.999 0。最低检测限为 0.4 μg/mL。样品回收率均大于 88%, 精密度 RSD 均小于 10%。结论: 该法是一种准确高效的检测方法, 为临床检测乌头碱中毒提供了依据。

[关键词] 乌头碱; 高效液相色谱法; 组织

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)07-0056-03

## Determination of Aconitine in Tissues of Rats by HPLC

LI Wen-dong, MA Chen\*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences &  
Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for determination of aconitine in tissues of rats. **Methods:** The Waters 2690-996 PAD system was adopted, the analytical column was a HAILSIL 100 ODS column (5 μm, 250 × 4.6 mm). The mobile phase was methanol, water, and diethylamine in the ratio of 75: 25: 0.1. The flow rate was 0.9 mL • min<sup>-1</sup>. The wavelength of detector was 240 nm. The tissue samples were added to 1.0 mmol/L HCl with weight and volume in the ratio of 1: 5, the above solution was collected after the samples were homogenized and centrifugalized. The solution was lyophilized and extracted by organic solvent. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the residue was redissolved into methanol, 30 μL was injected to the sampler. **Results:** Aconitine was detected in heart, liver, spleen,

lung, kidney of rat, none in brain and spinal cord. The linear range of heart, spleen, lung and kidney was 8.0 ng-2.0  $\mu$ g, the relation coefficients were 0.997 2, 0.998 6, 0.999 3 and 0.999 4 respectively. The linear range of liver was 0.4  $\mu$ g- 4.0  $\mu$ g and the relation coefficient was 0.999 0. The detection limit was 0.4  $\mu$ g/mL, the extracted recovery was 88%, the RSD of precision was less than 10%. **Conclusion:** It appears to be an accurate and effective method that can offer scientific basis for toxication of aconitine clinically.

[ **Key words** ] aconitine; HPLC; tissues

乌头碱(aconitine)为毛茛科乌头属植物的一种常见的含有二酯二萜的生物碱,具有抗炎、镇痛、局部麻醉和短暂的降压作用。由于乌头碱毒性强,治疗量与中毒量接近,容易引起乌头碱中毒发生,但由于乌头碱代谢迅速,故体内往往查不到乌头碱,不能提供乌头碱中毒的直接依据,本文建立了高效液相色谱法测定乌头碱在大鼠体内分布的方法,为临床检测乌头碱中毒提供了依据。

## 1 材料和方法

**1.1 试药和试剂** 乌头碱标准品(购自中国药品生物制品检定所);饱和碳酸氢钠溶液,乙酸乙酯,分析纯,北京化工厂;甲醇,优级纯,北京化工厂;水为双蒸水。

乌头碱标准溶液配制:称取适量于 2 mL 的容量瓶中,甲醇定容为 2.0 mg/mL,依实验要求稀释为各个浓度。

**1.2 动物** SD 大鼠雄性, (320  $\pm$  39) g, 由本院动物研究所繁育场提供。

**1.3 仪器** Waters 2690 996PAD 色谱系统, LD5-2A 型离心机(北京医用离心机厂); TDL-5-A 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); YKH III 液体快速混合器(江苏医疗器械厂); Heidolph DIAX900 高速匀浆机(德国)。

**1.4 色谱条件** 分析柱为 HAILSIL 100 C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm), 流动相为甲醇:水:二乙胺(75:25:0.1) 流速 0.9 mL/min, 检测波长 240 nm。

**1.5 组织样品处理** 乌头碱 0.2 mg/kg 灌胃大鼠(17 只), 共给药 10 次, 累积给药达 11.5 mg, 处死动物, 取脏器-20  $^{\circ}$ C 冷冻保存, 分析时, 解冻后滤纸吸干水分, 称重, 共计肝脏 62.12 g、肾脏 24.61 g、脾脏 6.28 g、心脏 13.38 g、肺 21.18 g、脑 20.61 g、脊髓 4.47 g, 按重量体积比(1:5) 加入 1.0 mmol/L HCl, 匀浆, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液置三角瓶中, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液调各个脏器的匀浆上清液 pH 值至 8~9, 置于 1 000 mL 的冷冻干燥瓶中, 进行冷干处

理至完全干透。用乙酸乙酯分别提取肝脏(30 mL  $\times$  3)、肾脏(25 mL  $\times$  3)、脾脏(15 mL  $\times$  3)、心脏(20 mL  $\times$  3)、肺(20 mL  $\times$  3)、脑(20 mL  $\times$  3)、脊髓(15 mL  $\times$  3), 合并各鼠提取液, 40  $^{\circ}$ C 减压蒸干, 将各个脏器样品残渣用甲醇溶解, 肝脏 800  $\mu$ L, 肾脏 600  $\mu$ L、脾脏 850  $\mu$ L、心脏 900  $\mu$ L、肺 700  $\mu$ L、脑 500  $\mu$ L、脊髓 1 300  $\mu$ L, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 30  $\mu$ L 供 HPLC 分析。

## 2 结果

**2.1 色谱行为** 乌头碱在心、肝、脾、肺、肾空白匀浆与给药匀浆色谱图显示, 空白组织匀浆对乌头碱的测定无干扰。

**2.2 标准曲线** 分别量取心、脾、肺、肾空白匀浆上清液 200  $\mu$ L, 加入乌头碱标准溶液(4, 20, 40, 100, 500, 1 000  $\mu$ g/mL) 各 20  $\mu$ L; 量取肝空白匀浆上清液 200  $\mu$ L, 加入乌头碱标准溶液(20, 40, 100, 500, 1 000, 2 000  $\mu$ g/mL) 各 20  $\mu$ L, 均加入 50  $\mu$ L 饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液碱化, 混匀, 以 1:5 比例加入乙酸乙酯旋涡混合 5 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 吹干, 用 200  $\mu$ L 甲醇溶解残渣, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 进样 20  $\mu$ L, HPLC 检测。以乌头碱标准品进样量( $\mu$ g) 对峰面积(Au) 作线性回归, 求出标准曲线, 计算组织样品中乌头碱含量。检测限: 以 S/N > 3 计, 乌头碱为 0.4  $\mu$ g/mL。

各器官标准曲线分别为:

心  $Y = 1.000 \times 10^6 X - 9 535$  ( $r = 0.997 2$ , 线性范围 8.0 ng- 2.0  $\mu$ g)

脾  $Y = 9.145 \times 10^5 X + 4.001 \times 10^4$  ( $r = 0.998 6$ , 线性范围 8.0 ng- 2.0  $\mu$ g)

肺  $Y = 1.000 \times 10^6 X + 2.277 \times 10^4$  ( $r = 0.999 3$ , 线性范围 8.0 ng- 2.0  $\mu$ g)

肾  $Y = 1.000 \times 10^6 X - 1.240 \times 10^4$  ( $r = 0.999 4$ , 线性范围 8.0 ng- 2.0  $\mu$ g)

肝  $Y = 9.734 \times 10^5 X + 9.026 \times 10^4$  ( $r = 0.999 0$ , 线性范围 0.04  $\mu$ g- 4.0  $\mu$ g)

**2.3 样品回收率实验** 取心、肝、脾、肺、肾空白脏器匀浆上清液 200  $\mu\text{L}$ , 每个脏器分为两组, 每组平行做 3 个, 1 组加入乌头碱标准溶液(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 40  $\mu\text{L}$ , 1 组加入乌头碱标准溶液(500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 40  $\mu\text{L}$ , 按上述标准曲线的预处理方法进行处理, 进样, 所测得乌头碱色谱峰面积值与标准溶液直接进样分析所得峰面积值对比, 求得样品回收率。数据见表 1, 回收率均大于 88%, 样品回收率符合生物药物分析要求。

**2.4 样品精密度实验** 取心、肝、脾、肺、肾空白脏器匀浆上清液 200  $\mu\text{L}$ , 每个脏器分为两组, 每组平行做 5 个, 1 组加入乌头碱标准溶液(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 30  $\mu\text{L}$ , 1 组加入乌头碱标准溶液(500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 30  $\mu\text{L}$ 。按上述标准曲线的预处理方法进行处理, 进样, 以标准曲线计算精密度。数据见表 1, 样品精密度在 1.9% ~ 5.8% 之间, 符合生物药物分析要求。

**2.5 各个脏器中所含乌头碱总量及每 g 脏器中的含量** 见表 2。

表 1 乌头碱大鼠脏器中的回收率与精密度

组织	加药量 $\mu\text{g}/\text{mL}$	回收率		精密度( $n=5$ )	
		平均值 (%)	RSD (%)	平均值 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD (%)
心	500	93.2	1.26	443	5.46
	50	88.73	7.45	38.6	5.05
肝	500	94.83	2.88	422	1.98
	50	102.27	0.20	40.4	4.49
脾	500	97.9	2.84	483.4	1.92
	50	98.0	5.98	32	3.83
肺	500	97.67	2.19	441.4	2.34
	50	104.5	0.41	31.8	5.62
肾	500	95.83	5.49	436	5.79
	50	101.62	3.68	44.2	2.95

表 2 乌头碱在大鼠脏器中的分布量

组织	总含量( $\mu\text{g}$ )	每 g 组织中含量( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
心	2.238	0.167 3
肝	106.74	1.718 3
脾	0.660 2	0.105 1
肺	1.806	0.085 3
肾	7.586	0.308 4

### 3 讨论

由于组织匀浆的量较大及给药量较小, 不适宜采用液液萃取与固相萃取的方法, 采用了冷冻干燥有机溶剂提取的预处理方法, 便于样品的富集, 简化操作步骤, 可减少样品的损失, 得到较好的效果。

由于乌头碱的毒性较大, 给药量受到限制, 因而必须累积生物样品才能达到分析的要求, 并且采用了冷冻干燥的预处理方法, 对其定量分析不适于采用内标法, 因而采用外标法对其定量分析。

分布实验表明乌头碱在大鼠各脏器中的分布程度由大到小顺序为: 肝、肾、心、肺、脾, 其中在肝脏中的分布量占总分布量的 89.7%, 占绝对优势, 这也进一步说明了乌头碱的体内代谢、排泄主要通过肝脏, 其次为肾脏; 乌头碱在心、肺中的分布与其较强的抑制呼吸和致心律失常的中毒机理相关。

在脑与脊髓中未检测出乌头碱, 一方面可能为乌头碱不通过血脑屏障, 不对中枢神经系统发生作用, 另一方面可能为检测器的灵敏度不够, 检测不出, 但通过乌头碱中毒的临床毒理分析, 其中毒剂量对中枢及末梢神经均有先兴奋后麻痹的作用<sup>[2]</sup>, 因而应该认为本方法的检测灵敏度未达到, 未检测出脑与脊髓中的乌头碱; 也说明乌头碱的主要作用部位不在中枢神经系统, 其毒性主要体现在对心血管与呼吸系统的损害上。

本文所建立的反相高效液相色谱法测定生物样品中乌头碱的含量, 样品回收率高, 灵敏度与精密度均较好, 为临床检测乌头碱中毒提供了依据。

### [参考文献]

- [1] 张文婷. 乌头碱类药材及中毒案例未知品中酯型生物碱的检出及测定[J]. 中国现代应用药学. 2002, 2: 140-142.
- [2] Michinao Mizugaki, Kitae Ito, Yoshiharu Ohyama, *et al.* Quantitative analysis of aconitum alkaloids in the urine and serum of a male attempting suicide by oral intake of aconitine extract[J]. J Anal Toxic, 1998, 22: 336-340.