

HPLC 同时测定生物样品中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的含量

栗贵^a, 廖林川^{b*}, 颜有仪^b, 杨林^b (四川大学, a. 华西药学院; b. 华西基础与法医学院, 成都 610041)

摘要: 目的 建立同时测定血液、肝组织中新乌头碱(mesaconitine)、乌头碱(aconitine)、次乌头碱(hypaconitine)含量的 HPLC 分析方法。方法 采用 Welchrom C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.03%四丁基氢氧化铵(用冰醋酸调至 pH 9.74) (58 : 42) 为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 230 nm。结果 生物样品中新乌头碱在 0.077~23 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999\ 8$), 乌头碱在 0.083~25 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999\ 8$), 次乌头碱在 0.08~24 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999\ 6$)。生物样品中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的回收率不低于 83.6%。生物样品中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的日内精密度和日间精密度分别在 5.1%和 9.3%以内。结论 本方法简便、灵敏、准确, 适用于血液、肝组织中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的分析。

关键词: 生物样品; 新乌头碱; 乌头碱; 次乌头碱; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1001-2494(2009)10-0946-05

Simultaneous Determination of Mesaconitine, Aconitine and Hypaconitine in Blood and Liver Speciman by HPLC

SU Gui^a, LIAO Lin-chuan^{b*}, YAN You-yi^b, YANG Lin^b (a. West China School of Pharmacy; b. Preclinical and Forensic Medicine College, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for simultaneous determination of Mesaconitine, Aconitine and Hypaconitine in blood and liver speciman. **METHODS** The samples were separated on the column of Welchrom ODS (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-0.03% tetrabutyl ammonium hydroxide (with glacial acetic acid to pH 9.74) (58 : 42) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was at 230 nm. **RESULTS** Mesaconitine in biological samples were linear in the ranged of 0.077~23 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 8$), and Aconitine was linear in the ranged of 0.083~25 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 8$), and Hypaconitine was linear in the range of 0.08~24 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 6$). The mean extraction recovery was over 83.6% in biological samples. The intra and inter-day precision of assay for Mspeciman, Aconitine and Hypaconitine were less than 5.1% and 9.3% in biological samples. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive, accurate, and suitable for the determination of Mesaconitine, Aconitine and Hypaconitine in blood and liver speciman for toxicological and clinical pharmaceutical analysis.

KEY WORDS: biological sample; mesaconitine; aconitine; hypaconitine; HPLC

新乌头碱、乌头碱、次乌头碱为毛茛科乌头属植物中常见的 3 种双酯二萜类生物碱, 是毛茛科乌头属植物主要活性成分, 具有强心、抗炎、镇痛等多种药理作用, 在我国民间与医药界被广泛使用。但由于它们毒性剧烈, 尤其对中枢神经系统毒性极强, 因此, 历年来因乌头类药物中毒甚至死亡的案件屡有发生, 情况比较严重。

由于乌头类生物碱在体内代谢迅速, 所以准确测定体内样品中乌头类生物碱的含量一直是困扰毒物分析工作者的一个难题。目前检测乌头类生物碱的分析方法主要有: 高效液相色谱法(HPLC)^[1-6]、气相色谱-质谱法(GC/MS)^[7]、液相色谱-质谱法(HPLC/MS)^[8-10]。本实验采用高效液相色谱法对血液和肝组织中的新乌头碱、乌头碱、次乌头碱同时

测定, 所建立的方法准确、快速、灵敏, 能够应用于临床检测和法医学鉴定等方面。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪配以二极管阵列检测器(美国 Agilent1100); 紫外-可见分光光度计(日本岛津 UV-260); 医用离心机(北京医用离心机厂); 微型旋涡混合仪 WH-2(上海沪西分析仪器有限公司); PH S-2TC 精密数字酸度计(浙江省象山县石浦海天电子仪器厂)。

1.2 药品与试剂

新乌头碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110799-200404)、乌头碱对照品(中国药品生物制

作者简介: 栗贵, 女, 硕士研究生 研究方向: 药物代谢及药物分析研究 *通讯作者: 廖林川, 男, 教授, 博士生导师 研究方向: 法医毒物分析、药物分析及药物代谢动力学研究 Tel: (028)85501636 E-mail: lincuanliao@163.com

品检定所,批号 110720-200410)、次乌头碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110798-200404)、盐酸布比卡因对照品(中国药品生物制品检定所,批号 101034-200801);乙腈(色谱纯);超纯水;四丁基氢氧化铵、乙醚、氨水等其余试剂均为国产分析纯。

1.3 对照品与内标溶液的配制

精密称取新乌头碱、乌头碱、次乌头碱对照品各 17.25, 18.75, 18.00 mg, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并稀释定容至刻度, 分别配制成含新乌头碱 $3.45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、乌头碱 $3.75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、次乌头碱 $3.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙腈储备溶液。再分别精密吸取新乌头碱、乌头碱、次乌头碱储备液各 1.0 mL, 混合, 得到含新乌头碱 $1.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、乌头碱 $1.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、次乌头碱 $1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品混合使用溶液。所配溶液于冰箱 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存备用, 临用前稀释至系列浓度。

精密称取盐酸布比卡因 1.5 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并稀释定容至刻度, 配制成浓度为 $0.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸布比卡因溶液作为内标溶液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

1.4 方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Welchrom C_{18} 柱 ($4.6 \text{ mm}\times 250 \text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), 同样填料的短柱为预柱; 流动相: 乙腈-0.03% 四丁基氢氧化铵(用冰醋酸调至 pH 9.74) (58:42); 流速: $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 230 nm, 同时用 DAD 检测器采集紫外全光谱; 柱温: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.4.2 样品前处理 准确吸取血液 1.0 mL 或肝组织匀浆液 1.0 g, 置于 10 mL 具塞离心管中, 加入 $0.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸布比卡因溶液(内标) $20\text{ }\mu\text{L}$, 涡旋混匀, 加入饱和氯化钠溶液 0.5 mL, 混匀。然后加入氨水 0.5 mL, 涡旋 1 min 后加入乙醚 6 mL, 涡旋振摇 3 min, 离心 ($3\text{ }500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 8 min 后, 取上清液于室温通空气流挥干, 残渣用流动相 $100\text{ }\mu\text{L}$ 溶解, 高速离心 ($1.2\times 10^4 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 5 min 后, 取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 上清液进样分析。

1.4.3 标准工作曲线的制备 用“1.3”项下对照品混合使用溶液配制含新乌头碱、乌头碱和次乌头碱不同浓度的对照品溶液。准确吸取 1.0 mL 空白血液数份, 加入 $0.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸布比卡因溶液(内标) $20\text{ }\mu\text{L}$, 再分别添加不同浓度的对照品溶液各 $20\text{ }\mu\text{L}$, 使血液中新乌头碱浓度分别为 0.077, 0.575, 1.15, 2.3, 11.5, $23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 乌头碱浓度分别为 0.083, 0.625, 1.25, 2.5, 12.5, $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 次乌头碱浓度分别为

0.080, 0.6, 1.2, 2.4, 12.0, $24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个浓度点平行添加 3 份, 涡旋混匀后按照“1.4.2”项下操作, 记录相应的峰面积; 另取 1.0 g 空白肝组织数份, 同上操作。分别以新乌头碱、乌头碱、次乌头碱浓度与其峰面积与内标峰面积之比作线性回归。

2 结果

2.1 色谱分离

按照“1.4.2”项下操作, 所得色谱图各峰之间分离度良好。空白血、空白血添加、空白肝、空白肝添加色谱图见图 1。由图 1 可以看出, 生物样品中内源性杂质对新乌头碱、乌头碱、次乌头碱和内标盐酸布比卡因的分析测定没有干扰, 所建立的方法可用于分析血液、肝组织样品。

2.2 线性范围与检测限

分别以新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的峰面积与内标峰面积比值 y 对 3 种物质的质量浓度 $\rho\text{ (mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 作线性回归, 各回归方程的相关系数 r 均大于 0.999, 相关性良好。按信噪比(S/N)=3 计算, 在血液和肝组织中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的检测限分别为 0.029, 0.031, $0.030 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 结果见表 1。

2.3 准确度和精密度

准确吸取 1.0 mL 空白血液数份, 加入 $0.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

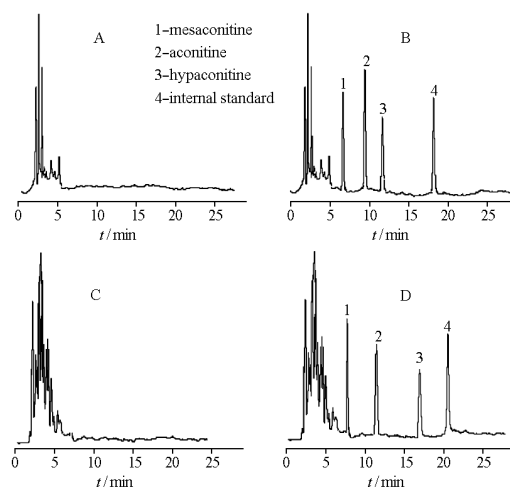


图 1 血液、肝组织中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱和内标的色谱图

A-空白血液; B-血液中添加新乌头碱(6.95 min)、乌头碱(9.76 min)、次乌头碱(12.01 min)和内标(18.51 min); C-空白肝组织; D-肝组织中添加新乌头碱(7.01 min)、乌头碱(10.40 min)、次乌头碱(15.43 min)和内标(18.74 min)

Fig.1 HPLC Chromatograms of mesaconitine and aconitine and hyaconitine and internal standard in blood and liver homogenate

A-blank blood; B-blood spiked with mesaconitine(6.95 min), aconitine(9.76 min), hyaconitine(12.01 min) and internal standard (18.51 min); C-blank liver homogenate; D-liver homogenate spiked with mesaconitine(7.01 min), aconitine(10.40 min), hyaconitine(15.43 min) and internal standard (18.74 min)

盐酸布比卡因溶液（内标）20 μL，再分别添加不同浓度的对照品溶液各 20 μL，制成高、中、低 3 种浓度的添加血样及肝组织样品，每个浓度点平行添加 6 份，涡旋混匀后按照“1.4.2”项下操作，记录相应的峰面积，按照所建立的标准工作曲线进行处理和分析；另取 1.0 g 空白肝组织数份，同上述操作。得到 3 种物质在血液和肝组织中的方法回收率，结果见表 2。于同日和不同日分别配制高、中、低 3 种浓度的添加血样及肝组织样品，每个浓度点平行添加 6 份，按照所建立的方法以及标准工作曲线进行处理和分析，得到 3 种物质在血液中的日内精密密度小于 4.7%($n=6$)，日间精密密度小于 9.3%($n=6$)；3 种物质在肝组织中的日内精密密度小于 5.1%($n=6$)，日间精密密度小于 8.6%($n=6$)。结果见表 2。

2.4 萃取回收率

分别配制高、中、低 3 种浓度的添加血样及肝组织样品，每个浓度点平行添加 6 份，按照“1.4.2”项下操作，记录相应的峰面积；另取相同体积同样

高、中、低浓度的对照品溶液，通空气流挥干，残渣用流动相 100 μL 溶解，取 20 μL 进样分析，记录相应的峰面积，分别计算相应浓度下添加血样及肝组织样品与各对照品的峰面积之比，得到 3 种物质在血液和肝组织中的平均萃取回收率均高于 83.6%。结果见表 3。

2.5 稳定性

将配制好的高、中、低 3 种浓度添加血样及肝组织样品，分别于室温放置 1, 2, 4, 12, 24 h 后，按照所建立的方法以及标准工作曲线进行处理和分析，得到 3 种物质在血液和肝组织中浓度的相对误差均在 15.6%以内。可见，在 24 h 内血液和肝组织中 3 种物质的含量变化不大，基本稳定。结果见表 4~6。

3 讨论

3.1 溶剂的选择

由于乌头类生物碱的分子中含酯基结构，易于

表 1 血液和肝组织中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的线性范围及检测限. $n=3$

Tab.1 Linear range and detection limit of mesaconitine and aconitine and hypaconitine in blood and liver homogenate. $n=3$

Biological matrix	Addition ingredient	Linear range/mg·L ⁻¹	Regression equation	Correlation coefficient	Limit of detection/mg·L ⁻¹
Blood	Mesaconitine	0.077–23.0	$y=0.496\ 7\rho-0.056\ 1$	0.999 8	0.029
	Aconitine	0.083–25.0	$y=0.474\ 8\rho-0.038\ 5$	0.999 9	0.031
	Hypaconitine	0.080–24.0	$y=0.469\ 9\rho-0.082\ 0$	0.999 7	0.030
Liver homogenate	Mesaconitine	0.077–23.0	$y=0.958\ 9\rho-0.010\ 3$	0.999 8	0.029
	Aconitine	0.083–25.0	$y=0.947\rho-0.043\ 7$	0.999 8	0.031
	Hypaconitine	0.080–24.0	$y=0.932\ 5\rho-0.070\ 5$	0.999 6	0.03

表 2 血液和肝组织中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的回收率及精密密度. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

Tab.2 Recovery and precision of mesaconitine and aconitine and hypaconitine in blood and liver homogenate. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

Biological matrix	Addition ingredient	Mass concentration /mg·L ⁻¹	Measure concentration /mg·L ⁻¹	Recovery /%	Intra-day precision /%	Inter-day precision /%
Blood	Mesaconitine	0.575	0.571±0.01	99.4±2.2	2.3	4.2
		2.3	2.480±0.05	107.7±2.5	1.9	2.5
		11.5	11.400±0.3	98.6±3.1	3.1	6.7
	Aconitine	0.625	0.601±0.01	96.1±3.3	2.2	5.4
		2.5	2.760±0.05	110.5±3.1	2.1	3.8
		12.5	12.300±0.4	98.3±3.3	1.6	2.0
	Hypaconitine	0.6	0.630±0.01	105.3±3.5	4.7	9.3
		2.4	2.480±0.06	103.2±2.9	2.3	3.8
		12.0	11.700±0.3	97.4±3.3	3.5	4.5
Liver homogenate	Mesaconitine	0.575	0.496±0.01	86.3±1.6	5.1	5.3
		2.3	2.270±0.03	98.7±1.2	2.2	2.7
		11.5	11.200±0.100	97.1±1.9	4.6	8.1
	Aconitine	0.625	0.583±0.01	91.5±3.1	2.9	6.6
		2.5	2.470±0.04	98.8±1.8	1.8	2.4
		12.5	12.000±0.100	96.0±1.9	2.6	2.0
	Hypaconitine	0.6	0.570±0.01	91.5±3.4	3.2	8.6
		2.4	2.370±0.05	98.9±2.1	2.3	3.4
		12.0	11.200±0.20	93.5±2.2	4.9	7.2

表 3 血液和肝组织中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的萃取回收率. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

Tab.3 Extraction recovery of nesaconitine and aconitine and hypaconitine in blood and liver homogenate. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

Biological matrix	Addition ingredient	Mass concentration /mg·L ⁻¹	Extraction recovery /%
Blood	Mesaconitine	0.575	86.2±3.8
		2.3	90.9±2.3
		11.5	89.4±1.8
	Aconitine	0.625	85.9±3.4
		2.5	91.5±4.0
		12.5	90.7±1.9
	Hypaconitine	0.6	84.3±4.2
		2.4	89.1±3.7
		12.0	87.7±4.4
Liver homogenate	Mesaconitine	0.575	83.6±1.9
		2.3	87.1±1.1
		11.5	87.9±1.7
	Aconitine	0.625	86.4±3.3
		2.5	85.6±0.8
		12.5	88.5±2.1
	Hypaconitine	0.6	84.1±1.0
		2.4	85.6±1.3
		12.0	87.4±2.2

表 4 血液和肝组织中新乌头碱的稳定性考察. $n=3$

Tab.4 Stability of mesaconitine in blood and liver homogenate. $n=3$

t/h	Mass concentration /mg·L ⁻¹	Measure concentration /mg·L ⁻¹	Blood relative error /%	Relative standard deviation/%	Measure concentration /mg·L ⁻¹	Liver relative error /%	Relative standard deviation/%
1	0.575	0.583	1.3	1.2	0.497	-13.6	0.1
	2.3	2.53	10.0	0.4	2.31	0.5	2.0
	11.5	11.3	-1.9	2.2	10.8	-6.0	3.5
2	0.575	0.586	1.9	2.6	0.501	-12.9	0.9
	2.3	2.52	9.8	0.7	2.41	4.9	2.8
	11.5	11.2	-2.4	1.3	11.0	-3.5	0.4
4	0.575	0.582	1.3	0.9	0.471	-15.3	1.7
	2.3	2.51	9.1	0.3	2.45	6.4	0.7
	11.5	11.2	-2.6	2.0	10.9	-5.3	1.2
12	0.575	0.581	1.1	1.0	0.47	-14.6	1.6
	2.3	2.48	7.9	1.0	2.48	7.7	0.4
	11.5	11.3	-2.1	0.6	11	-4.8	1.4
24	0.575	0.58	0.8	0.7	0.47	-15.1	1.0
	2.3	2.49	8.2	0.4	2.49	8.2	1.0
	11.5	11.3	-1.7	2.9	10.9	-5.0	1.9

表 5 血液和肝组织中新乌头碱的稳定性考察. $n=3$

Tab.5 Stability of aconitine in blood and liver homogenate. $n=3$

t/h	Mass concentration /mg·L ⁻¹	Measure concentration /mg·L ⁻¹	Blood Relative error/%	Relative standard deviation/%	Measure concentration /mg·L ⁻¹	Liver Relative error/%	Relative standard deviation/%
1	0.625	0.61	-2.4	1.4	0.543	-13.1	1.4
	2.5	2.82	12.6	0.4	2.43	-2.8	1.5
	12.5	12.2	-2.5	3.4	11.4	-9.0	3.0
2	0.625	0.613	-2.0	3.2	0.542	-13.3	1.9
	2.5	2.8	11.9	0.9	2.53	1.2	2.3
	12.5	12.2	-2.7	0.5	11.7	-6.8	2.2
4	0.625	0.604	-3.3	2.4	0.526	-15.4	1.3
	2.5	2.82	12.6	1.1	2.57	2.7	0.6
	12.5	12.2	-2.4	1.1	11.4	-8.5	4.5
12	0.625	0.608	-2.7	2.6	0.523	-14.4	2.4
	2.5	2.77	10.9	2.7	2.6	4.1	0.6
	12.5	12.2	-2.3	0.6	11.5	-7.7	4.1
24	0.625	0.6	-4.7	4.1	0.52	-15.6	1.4
	2.5	2.78	11.3	2.6	2.59	3.6	1.3
	12.5	12.3	-1.9	2.3	11.5	-8.0	5.4

水解为极性更大的化合物。乌头类生物碱尤其在碱性溶液或加热的条件下会迅速降解，在非惰性有机溶剂乙醇中也不太稳定，在酸水溶液和对质子惰性的有机溶剂中较稳定^[10]。根据以上结论以及乙腈的截止波长在 210 nm 处，本实验采用乙腈作为配制标准样品储备液。

3.2 前处理方法的优化

本实验添加了饱和氯化钠溶液以达到沉淀蛋白质、防止乳化的作用。

乌头类生物碱的萃取溶剂大多数选用乙醚、乙酸乙酯、三氯甲烷等有机溶剂。结果发现，用乙酸乙酯和三氯甲烷作为萃取溶剂，样品中的杂质较多，会干扰新乌头碱、乌头碱、次乌头碱与内标盐酸布比卡因的分析。用乙醚进行提取时，样品中的杂质较少，且提取率均能达到 83.6%以上。乙醚易挥干，可以缩短加热时间，减少水解，便于操作。

3.3 检测波长的选择

表 6 血液和肝组织中次乌头碱的稳定性考察. *n*=3
Tab.6 Stability of Hypaconitine in blood and liver homogenate. *n*=3

<i>t</i> / h	Mass concentration /mg·L ⁻¹	Measure concentration /mg·L ⁻¹	Blood Relative error/%	Relative standard deviation/%	Measure concentration /mg·L ⁻¹	Liver Relative error/%	Relative standard deviation/%
1	0.6	0.649	8.2	1.0	0.544	-9.4	1.3
	2.4	2.6	8.5	1.4	2.43	1.1	2.6
	12.0	11.9	-1.1	2.4	11.0	-8.5	2.9
2	0.6	0.651	8.6	2.3	0.558	-7.0	1.0
	2.4	2.59	7.9	1.9	2.56	6.6	2.5
	12.0	11.7	-2.5	0.8	11.2	-6.8	2.2
4	0.6	0.638	6.3	2.7	0.531	-11.5	1.4
	2.4	2.61	8.6	0.6	2.59	7.8	0.8
	12.0	11.7	-2.2	1.9	11.0	-8.3	4.8
12	0.6	0.611	1.8	0.3	0.535	-10.9	2.0
	2.4	2.48	3.3	0.7	2.62	9.3	1.0
	12.0	11.9	-1.2	0.4	11.1	-7.7	3.9
24	0.6	0.63	4.9	3.3	0.53	-11.8	0.3
	2.4	2.69	11.9	0.4	2.66	11.0	1.6
	12.0	11.7	-2.3	2.8	10.8	-9.6	1.7

对新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的乙腈溶液进行紫外吸收光谱扫描,结果新乌头碱、乌头碱、次乌头碱均在 230 nm 处有最大吸收。采用二极管阵列检测器考察了 230, 235, 240 nm 处的谱图特征。结果表明,在此分析条件下 230 nm 处基线平滑,谱图特征性强。故确定检测波长为 230 nm。

3.4 流动相的选择

考察了甲醇-0.05%三乙胺、乙腈-0.5%氨水溶液、乙腈-0.03 mol·L⁻¹醋酸铵缓冲溶液(pH 10.5) 以及乙腈-0.03%四丁基氢氧化铵(用冰醋酸调至 pH 9.74)的流动相,结果证实,3 种生物碱在甲醇中非常不稳定,所以不宜使用以甲醇为溶剂的流动相。在乙腈-0.5%氨水(20:80)溶液条件下,3 种乌头类生物碱峰形变窄、变高,且保留时间较小,其他的成分干扰样品不能分开。在乙腈-醋酸铵缓冲溶液(pH 10.5)条件下,3 种乌头类生物碱峰形较好,但是分离度小,测定样品时,有时受到其他成分干扰,分离效果不是最佳。而在乙腈-0.03%四丁基氢氧化铵理论塔板数均不低于 4 500,对称因子接近 1,且分离度均大于 1.5,能够达到较好的分离效果。

同时考察了 0.01%, 0.03%, 0.05%, 0.1%四丁基氢氧化铵配制的流动相,实验表明,0.03%四丁基氢氧化铵配成的流动相得到的峰形较宽,分离度较好,且色谱峰的对称因子最接近 1。

4 结 论

综上所述,本实验建立的血和肝组织中同时检测新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的方法简便、灵敏。经过方法学验证,其准确度、精密度和萃取回收率上都达到了生物分析的要求,能满足法医毒物

分析实际应用和乌头类生物碱体内过程研究的需要。

REFERENCES

[1] LIU X P, YANG S Y, PAN G M. Determination of aconitine in biological samples [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2002, 20 (5): 81-83.

[2] OHTA H, SETO Y, TSUNODA N. Determination of aconitum alkaloids in blood and urine samples. I. High - performance liquid chromatographic separation, solid-phase extraction and mass spectrometric confirmation[J]. *J Chromatogr B*, 1997, 691(2): 351-356.

[3] ZHAO Y Y, CUI X M, DAI Y. Determination of Active Ingredients in Radix Aconiti Kusnezoffii by HPLC [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2007, 142 (11): 815-818

[4] PENG B, YANG Y H, LIU S R. Studies on separation and determination of three main alkaloids in the traditional Chinese medicine Radix Aconiti and RadixAconiti lateralis preparata slices by RP- Ion Pair HPLC[J]. *Chin J Pharm Ana*l(药物分析杂志), 1995, 15 (6): 13-16

[5] ZHANG Y H, WU Y N, LI Z G, et al. Determination of Aconitine in Fengshi Antai tablets by HPLC [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志) , 2005, 40 (18): 1416-1417

[6] WENG X G , NIE S Q, HUANG L Q. Determination of content changes of hypaconitine in preparations of aconite matching other herbs in “pinelliatuber, snakegourd fruit, fritillaria, japanese ampelopsis root and common bletilla tuber counteract aconite”by HPLC [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志) , 2004, 39 (1): 57-59

[7] WANG Z H, HE Y, ZHANG J Z, et al. Detection of aconitine in biological samples by GC/MS [J] . *Chin J Forensic Med* (中国法医学杂志) , 2003, 18 (3): 145-146.

[8] ZHANG H G, ZHONG D F, ZHANG H Q. Determination of aconitine and its metabolites in animal experiment by LC/ESI-MSn [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2003, 12 (1): 55.-56

[9] GAILLARD Y, PEPIN G. Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by high - performance liquid chromatograpy-(tandem) mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 1999, 733(1):181-229.

[10] LIAO L C. *Forensic Toxicological Analysis* (法医毒物分析) [M]. Beijing: High Education Press, 2006:141-142.

(收稿日期: 2008-10-16)