

超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定血浆和尿液中马桑亭和马桑宁

张秀尧*, 蔡欣欣, 张晓艺, 李瑞芬

(温州市疾病预防控制中心, 浙江温州 325001)

摘要:建立了超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术测定血浆和尿液中马桑中毒标志物马桑亭和马桑宁的方法。血浆和尿液样品经固相支持液液萃取法提取净化后,溶于15% (v/v) 甲醇水溶液中,以Cortecs C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.6 μm)作为分析柱进行分离,电喷雾负离子多反应监测(MRM)模式下检测,以氟苯尼考作为内标物,基质工作曲线内标法定量。血浆和尿液中马桑亭和马桑宁的平均加标回收率为86.2%~110%,相对标准偏差为5.1%~14.6% (n=6),血浆中马桑亭和马桑宁的检出限(S/N=3)分别为0.01 μg/L和0.1 μg/L,尿液中马桑亭和马桑宁的检出限分别为0.03 μg/L和0.3 μg/L。本法简单、灵敏、准确,可用于血浆和尿液中马桑亭和马桑宁的中毒检测。

关键词:超高效液相色谱-三重四极杆质谱法;马桑亭;马桑宁;马桑中毒;血浆;尿液

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2019)02-0149-06

Determination of coriatin and corianin in plasma and urine using ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

ZHANG Xiuyao*, CAI Xinxin, ZHANG Xiaoyi, LI Ruifen

(Wenzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Wenzhou 325001, China)

Abstract: An ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method has been developed for the determination of coriatin and corianin in plasma and urine, which are the biomarkers of poisoning caused by *Coriaria sinica* Maxim. Plasma and urine samples were extracted and purified using a solid supported liquid/liquid extraction method. Chromatographic separation was performed on a Cortecs C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) using a gradient elution of methanol and water. Coriatin and corianin were detected using negative electrospray ionization tandem mass spectrometry in multiple reaction monitoring (MRM) mode and quantified via a matrix working standard curve internal standard method; florfenicol was used as the internal standard. The assay was linear in the calibration range of 0.03–5.0 μg/L for coriatin and 0.3–50 μg/L for corianin in plasma, and 0.1–10 μg/L and 1–100 μg/L for coriatin and corianin in urine, respectively. The average recoveries were 86.2%–110% for coriatin and corianin in plasma and urine with relative standard deviations of 5.1%–14.6% (n=6). The limits of detection (S/N=3) for coriatin and corianin were 0.01 μg/L and 0.1 μg/L in plasma, and 0.03 μg/L and 0.3 μg/L in urine, respectively. The method is simple, sensitive and accurate for the determination of coriatin and corianin in plasma and urine for toxicological purposes.

Key words: ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry; coriatin; corianin; poisoning caused by *Coriaria sinica* Maxim; plasma; urine

马桑 (*Coriaria sinica* Maxim) 是马桑科马桑属植物, 主要分布于我国西北、西南等地, 全株有毒, 尤以未成熟的果实毒性最大, 马桑果为豌豆大小, 未成熟时为绿色, 成熟时由鲜红色渐变为紫黑色, 外形酷似桑葚, 味微甜, 常被儿童采食引起中毒, 人误食马桑青果 15~60 g 即可中毒^[1-5]。同时, 马桑属植物又是新西兰广泛分布的有毒原生植物, 若蜜蜂采集到以马桑汁液为生的澳洲广翅蜡蝉 (*Scolytopa australis*) 所分泌的蜜露, 则蜂蜜可能有毒, 从而可能会引起食用者中毒^[6-9]。马桑的毒性成分主要有马桑内酯(马桑毒素, coriamyrtin)、羟基马桑内酯(吐丁内酯, tutin)、马桑亭 (coriatin)、马桑宁 (corianin) 等倍半萜内酯类化合物^[10,11], 化学结构见图 1。马桑内酯和羟基马桑内酯等为 γ -氨基丁酸 (GABA) 受体拮抗剂, 小鼠皮下注射马桑根煎剂、叶煎剂、茎煎剂的半数致死量 (LD_{50}) 分别为 25 g/kg、9.75 g/kg 和 20 g/kg^[2], 羟基马桑内酯的 LD_{50} 为 3.2 mg/kg (bw)^[8]。马桑中毒潜伏期为 0.5~3 h, 轻者会有恶心、呕吐、胸闷、腹部不适、头昏和嗜睡等症状, 可自行恢复; 重者则反复呕吐、头晕、心悸、全身发麻、突然昏迷而进入抽搐期, 严重者呼吸衰竭而死亡^[12]。因此, 迫切需要建立一种快速确定马桑中毒的检测方法。

马桑内酯类化合物的检测方法报道较少, 早期报道的薄层色谱扫描法主要适用于生药及注射液中有效成分的测定^[13], 近年来殷耀等^[14]采用超高效

液相色谱-高分辨质谱联用法在电喷雾电离 (ESI) 负离子模式下测定蜂蜜中的马桑亭、马桑宁和羟基马桑内酯, 检出限为 0.05 mg/kg, 定量限为 0.1 mg/kg。Fields 等^[8]采用丙酮-水溶液提取、二氯甲烷-正己烷萃取、硅胶固相萃取柱净化, 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法在大气压化学电离 (APCI) 正离子模式下测定人血清中羟基马桑内酯, 采用大体积进样 (100 μ L), 检出限达 0.1 ng/mL。目前有关血浆和尿液中马桑亭和马桑宁的检测方法未见公开报道。本文选用马桑亭和马桑宁作为马桑中毒的标志物, 采用固相支持液液萃取法提取和净化样品, 超高效反相液相色谱分离, 三重四极杆质谱法检测, 内标法定量, 方法快速、灵敏、准确。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪 (包括 ACQUITY UPLC BSM 二元溶剂管理系统、ACQUITY UPLC FTN 样品管理系统、ACQUITY UPLC CM-A 色谱柱管理系统和 Empower 3 工作站, 美国 Waters 公司); QTRAP 6500 三重四极杆/线性离子阱复合质谱仪 (Analyst 1.6.2 软件, 美国 AB SCIEX 公司); MS3 旋涡混旋器 (德国 IKA-WERKE 公司); 24 孔 N-EVAP 氮吹仪 (美国 Organomation 公司); Gradient A10 Milli-Q 超纯水器 (法国 Millipore 公司)。

甲醇、乙腈和叔丁基甲醚 (液相色谱溶剂级, 德国 Merck 公司), 乙酸乙酯 (液相色谱溶剂级, 美国 Tedia 公司)。Cleanert SLE 固相支持液液萃取柱 (200 mg/3 mL, 天津博纳艾杰尔科技有限公司), 亲水聚四氟乙烯滤膜针式过滤器 (直径 13 mm, 孔径 0.22 μ m, 上海安谱实验科技股份有限公司)。羟基马桑内酯、马桑亭和马桑宁标准物质 (纯度 $\geq 98\%$, 云南西力生物技术公司), 氟苯尼考标准物质 (纯度 $\geq 98\%$, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司), 溶于甲醇制成 100 mg/L 的标准物质储备液, 临用时用甲醇稀释至所需浓度的混合标准溶液, $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。健康人血浆购自温州市中心血站, 尿液由健康人提供。

1.2 样品前处理

吸取 1.00 mL 血浆或尿液于 2 mL Eppendorf 管中, 加入 10 μ L 0.10 mg/L 氟苯尼考内标标准溶液和 200 μ L 1% (v/v) 氨水溶液, 混匀, 待净化。

吸取 200 μ L 上述试液加至 Cleanert SLE 固相支持液液萃取柱中, 待试液进入填料后静置 5 min

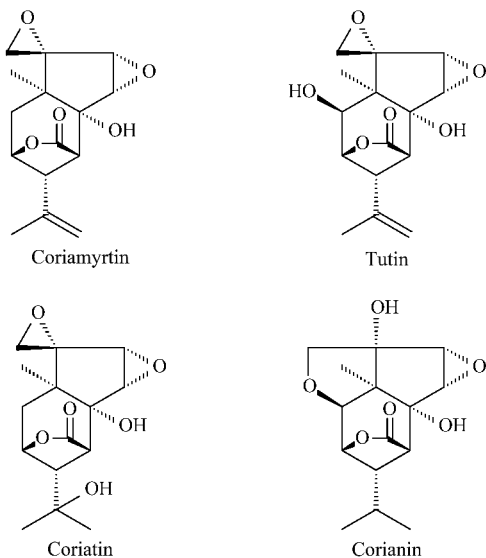


图 1 马桑内酯、羟基马桑内酯、马桑亭和马桑宁的化学结构
Fig. 1 Chemical structures of coriamyrtin, tutin, coriatin and corianin

以上,用 4.0 mL 叔丁基甲醚洗脱(流速 1~2 mL/min),收集洗脱液,于 50 °C 氮气吹干,加入 200 μ L 15% (v/v) 甲醇水溶液,涡旋 15 s,过 0.22 μ m 滤膜,待测。

1.3 仪器条件

1.3.1 色谱条件

Cortecs C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.6 μ m)和 Cortecs C₁₈ 保护柱(5 mm×2.1 mm, 1.6 μ m)(美国 Waters 公司)。流动相 A: 甲醇;流动相 B: 水。梯度洗脱程序:0~3.50 min, 15% A~54% A; 3.50~3.60 min, 54% A~95% A; 3.60~5.50 min, 95% A; 5.50~5.60 min, 95% A~15% A; 5.60~7.50 min, 15% A; 流速:0.250 mL/min;柱温 45 °C;进样体积 10 μ L。乙腈作为清洗溶剂(Wash solvent), 15% (v/v) 甲醇溶液作为消除溶剂(Purge solvent)。

1.3.2 质谱条件

电喷雾离子源负离子多反应监测(MRM)模式检测。离子化电压(IS): -4 500 V, 离子源温度(TEM): 350 °C, 气帘气(CUR)压强:277 kPa(40 psi), 喷雾气(GS1)压强:345 kPa(50 psi), 辅助加热气压强(GS2): 345 kPa(50 psi), 碰撞器(CAD): Medium。其他参数见表 1。

表 1 马桑亭、马桑宁及内标物氟苯尼考的质谱参数
Table 1 MS parameters for coriatin, corianin, and the internal standard (florfenicol)

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP/V	CE/eV
Coriatin	295.1	201.0*	-100	-17
		219.0	-100	-14
Corianin	293.1	160.9*	-40	-29
		205.0	-40	-16
Florfenicol	356.1	185.0*	-90	-25

DP: declustering potential; CE: collision energy. * Quantitative ion.

运行开始时,色谱柱流出液经六通切换阀切换至废液直到 2.40 min,六通切换阀将柱流出液切换到质谱离子源中,质谱同时采集数据直到 3.10 min,六通切换阀又将柱流出液切回至废液中。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

分别在电喷雾和大气压化学电离正负离子电离方式下对羟基马桑内酯、马桑亭和马桑宁的质谱测定条件进行优化,在以上 4 种电离模式下,羟基马桑

内酯的响应值均很低,不适用于生物样品的低浓度测定。在电喷雾和大气压化学电离负离子电离模式下,马桑亭和马桑宁均有一定的响应,且在电喷雾负离子电离模式下的响应更高,约为大气压化学电离的 30 倍,故后续试验在电喷雾负离子电离模式下进行优化。第 1 级四极杆全扫描时出现 $[M-H]^-$ 峰,以 $[M-H]^-$ 作为母离子进行碰撞解离,通过子离子扫描得到目标化合物的碎片离子信息,见图 2,然后再对去簇电压、碰撞能量等参数进行优化,使得分子离子对的信号达到最高。每种待测物选择响应最高的两对分子离子对,以其中响应高的分子离子对作为定量离子对,另一分子离子对作为定性离子对。再设定合适的峰驻留时间(dwell time)使得色谱峰的采样点数在 15~20 之间,得到较好的定量重复性。优化后的质谱条件见 1.3.2 节。

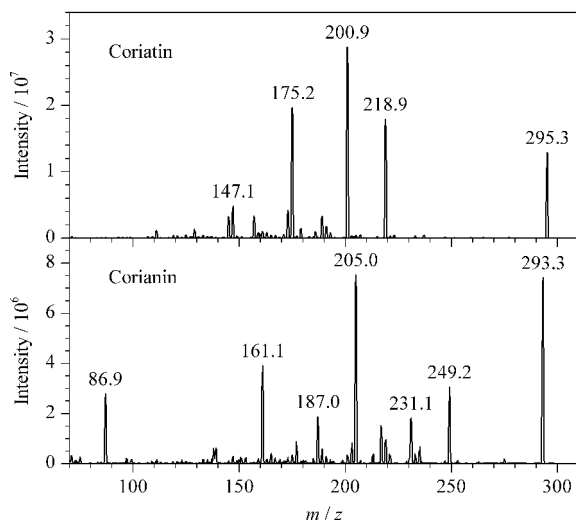


图 2 马桑亭和马桑宁的子离子扫描谱图
Fig. 2 Product ion scan spectra of coriatin and corianin

2.2 超高效液相色谱条件优化

试验比较了 100 mm×2.1 mm 规格的 BEH C₁₈ (1.7 μ m)、HSS T₃ (1.8 μ m)、Cortecs C₁₈ (1.6 μ m) 等色谱柱对马桑亭和马桑宁的分离效果,结果显示 Cortecs C₁₈ 色谱柱的色谱响应和峰形均最佳,因此选为分析柱。考察了以甲醇-水、乙腈-水以及加入低浓度的甲酸、乙酸铵缓冲盐和 0.05% (v/v) 氨水后的甲醇-水、乙腈-水作为流动相的分离效果,结果表明甲醇-水的响应值最高,故选为流动相。同时又对流动相梯度洗脱程序和柱温等分离条件进行了优化,最终使得待测物的色谱保留时间适当,优化好的色谱条件见 1.3.1 节。马桑亭和马桑宁的化学

结构非常相似,在本分离条件下无法达到分离,由于它们的分子离子对各不相同,并不影响在质谱上的检测和定量。

2.3 内标物的选择

采用内标法定量可以校正待测物在样品前处理中的损失,可以校正质谱测定过程中的基质效应等,从而得到更好的准确度和精密度,最理想的是采用稳定同位素内标法。由于目前马桑亭和马桑宁还没有商品化的同位素内标,因此尝试采用能在电喷雾负离子模式下电离的氯霉素、氟苯尼考和甲砒霉素作为内标物,结果显示氟苯尼考的保留时间为 2.74 min,与马桑亭 2.76 min 和马桑宁 2.80 min 相近,最终选用氟苯尼考作为内标物,可以校正质谱检测时的波动性、样品前处理过程中的损失和基质效应等。

2.4 样品前处理方法优化

固相支持液液萃取法(solid supported liquid/liquid extraction, SLE)采用多孔结构的硅藻土作为载体材料,当含水量高的血浆或尿液样品上样后,样品被吸附于硅藻土微孔表面形成液膜,加入与水不互溶的洗脱溶剂时,洗脱溶剂进入硅藻土微孔内与水性的液膜进行微观的液液萃取,待测物被洗脱溶剂从样品液中萃取出来,而磷脂、蛋白质等杂质则留在硅藻土吸附的样品液中,达到待测物同时提取和净化的目的。其操作简便快速,是一种高通量的样品处理方法,已应用于生物样品的前处理^[15]。

马桑亭和马桑宁属倍半萜内酯类物质,为脂溶性化合物,适合于固相支持液液萃取法提取和净化,试验选用乙酸乙酯和叔丁基甲醚作为洗脱溶剂进行比较,叔丁基甲醚在提取回收率、基质效应、基线噪声和基质干扰等方面均优于乙酸乙酯,最终选作洗脱溶剂;在各 3 份 1.0 mL 尿液和血浆中分别加入 0.2 mL 3% (v/v) 高氯酸、水和 1% (v/v) 氨水,代表酸性、中性和碱性条件进行试验,结果显示在碱性条件下,基质干扰和基质效应小、基线噪声低,可能是在碱性条件下,尿液中大量酸性代谢成分未被萃取,试验最终选择在碱性条件下以叔丁基甲醚进行洗脱。

在空白血浆和尿液的处理残渣中,加入 200 μL 1.0 $\mu\text{g/L}$ 马桑亭和 10.0 $\mu\text{g/L}$ 马桑宁的混合标准溶液制成基质标准溶液,基质效应(matrix effect, ME)通过基质标准溶液和溶剂标准溶液中待测物

色谱峰面积的比值进行评估^[16],平行试验 5 次,结果显示血浆中马桑亭和马桑宁的平均基质效应分别为 98.6% (RSD 为 5.2%) 和 84.6% (RSD 为 5.8%),尿液中平均基质效应分别为 78.1% (RSD 为 5.9%) 和 76.4% (RSD 为 6.1%),显示有一定的基质效应;提取回收率通过加标样品处理液和基质标准溶液中待测物色谱峰面积的比值进行评估^[16],平行试验 5 次,血浆中马桑亭和马桑宁的平均提取回收率分别为 71.2% (RSD 为 5.1%) 和 73.7% (RSD 为 5.9%),尿液中分别为 68.7% (RSD 为 6.1%) 和 78.0% (RSD 为 5.8%)。以上试验显示在测定过程中马桑亭和马桑宁存在一定的基质效应,且平均提取回收率在 68.7%~78.0% 之间,提示不能采用纯溶剂标准溶液或用基质溶液作为溶剂配制的标准溶液进行定量,应采用基质工作曲线法进行定量,即在样品中加入标准溶液系列,按样品前处理方法制备再测定得到的工作曲线,期望能够补偿马桑亭和马桑宁在样品处理时的损失和基质抑制效应。

2.5 方法的线性范围、检出限和定量限

分别在 6 份空白血浆样品和 6 份空白尿液样品中加入适量马桑亭和马桑宁混合标准溶液,使马桑亭的质量浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0 $\mu\text{g/L}$,马桑宁的质量浓度分别为 1、2、5、10、50、100 $\mu\text{g/L}$ (各含有 1.0 $\mu\text{g/L}$ 氟苯尼考标准溶液),按 1.2 节进行样品前处理后再测定,采用 MultiQuant 定量软件进行数据处理,以定量离子对与内标物的峰面积比值(Y)对标准溶液的质量浓度(X , $\mu\text{g/L}$)进行回归(权重取 $1/X$),结果见表 2,相关系数均优于 0.996,线性关系良好。

在空白血浆和尿液样品中分别加入低浓度的马桑亭和马桑宁进行测定,以分子离子对的信噪比 ≥ 3 时的样品浓度作为检出限(LOD),以信噪比 ≥ 10 时的样品浓度作为定量限(LOQ),测得血浆和尿液中马桑亭和马桑宁的检出限和定量限见表 2。定量限浓度水平加标的血浆样品的色谱图见图 3。

2.6 样品的加标回收和精密度试验

在空白血浆和尿液样品中分别添加 4 个质量浓度水平的马桑亭和马桑宁标准溶液,按 1.2 节进行样品处理和测定,每个添加水平平行试验 6 次,血浆和尿液中马桑亭和马桑宁的平均加标回收率为 86.2%~110%,相对标准偏差为 5.1%~14.6% (见表 3),符合痕量分析的要求。

表 2 血浆及尿液基质中马桑亭和马桑宁的回归方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of coriatin and corianin in plasma and urine matrices

Matrix	Compound	Regression equation	Correlation coefficient (r)	Linear range/ $(\mu\text{g/L})$	LOD/ $(\mu\text{g/L})$	LOQ/ $(\mu\text{g/L})$
Plasma	coriatin	$Y=0.5676X+0.0073$	0.9993	0.03–5.0	0.01	0.03
	corianin	$Y=0.4568X+0.0054$	0.9993	0.3–50	0.1	0.3
Urine	coriatin	$Y=0.5528X+0.0181$	0.9997	0.1–10	0.03	0.1
	corianin	$Y=0.4487X+0.00051$	0.9969	1–100	0.3	1

Y: peak area ratio of the quantitative ions of analyte to internal standard (weight $1/X$); X: mass concentration, $\mu\text{g/L}$.

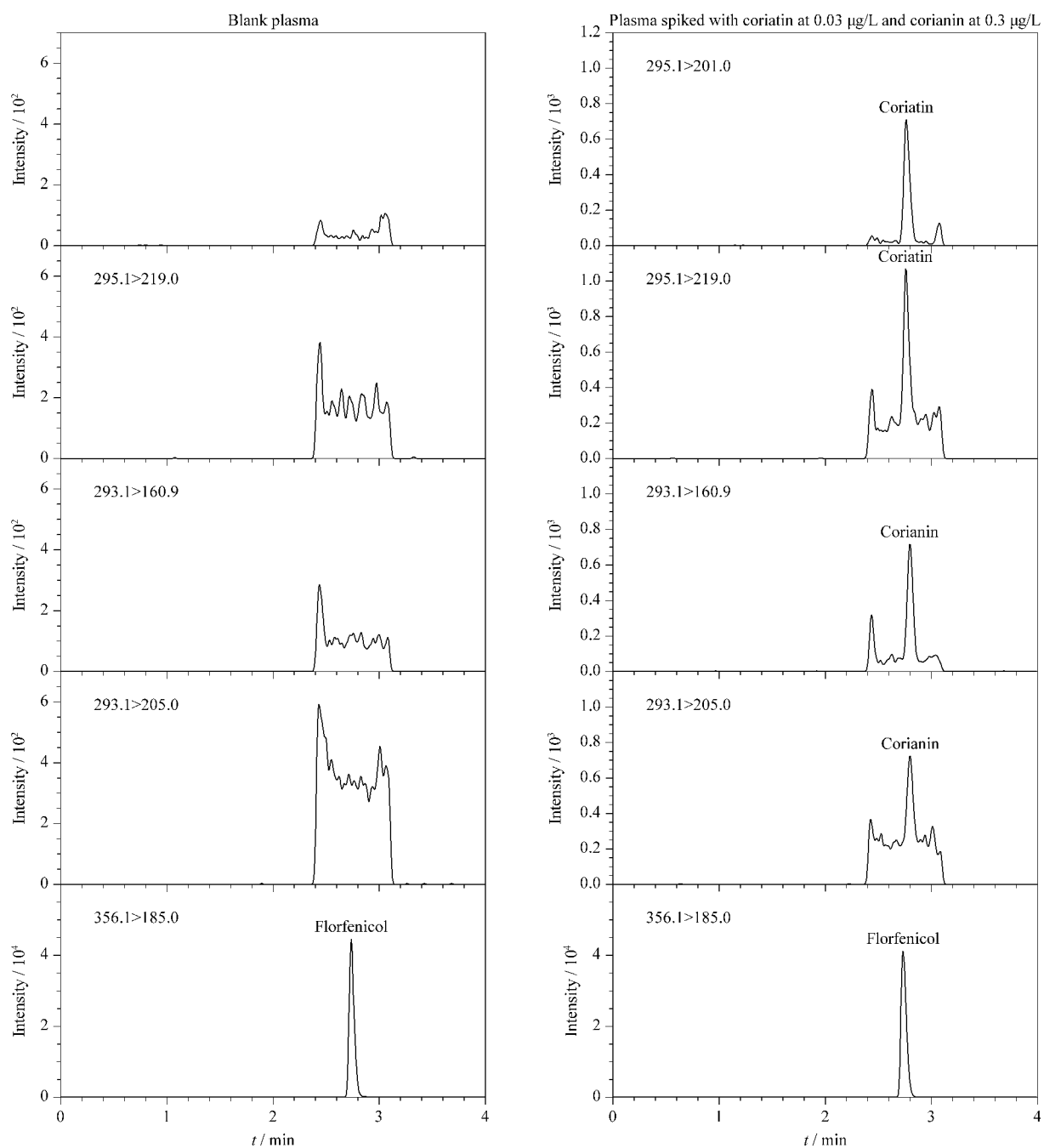


图 3 空白血浆及血浆加标样品中马桑亭和马桑宁的 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 3 UPLC-MS/MS chromatograms of coriatin and corianin in a blank plasma and a plasma sample spiked with coriatin and corianin

表 3 血浆和尿液中马桑亭和马桑宁在 4 个加标水平下的回收率和精密度 ($n=6$)

Table 3 Recoveries and RSDs of coriatin and corianin at four levels in plasma and urine samples ($n=6$)

Compound	Matrix	Spiked level/ ($\mu\text{g/L}$)	Found/ ($\mu\text{g/L}$)	Recovery/ %	RSD/ %
Coriatin	plasma	0.03	0.03	100.0	13.3
		0.1	0.11	110.0	9.4
		1.0	0.95	95.0	7.5
		4.0	3.45	86.2	5.4
	urine	0.1	0.1	100.0	13.7
		0.5	0.5	100.0	8.6
		2.0	1.9	95.0	5.7
		8.0	7.4	92.5	4.2
Corianin	plasma	0.3	0.3	100.0	12.5
		1.0	1.1	110.0	5.3
		10.0	9.2	92.0	8.7
		40.0	41.6	104.0	5.1
	urine	1	1.1	110.0	14.6
		5.0	5.1	102.0	10.2
		20.0	18.9	94.4	6.7
		80.0	83.8	104.8	7.9

3 结论

本文建立了测定血浆和尿液中马桑中毒标志物马桑亭和马桑宁的超高效液相色谱-三重四极杆质谱检测方法。采用固相支持液液萃取法处理样品,简化了操作步骤,通过对色谱分离和质谱检测等条件的优化,得到了较高的检测灵敏度。方法学验证结果表明,方法快速、简便,灵敏度高,准确度和精密度好,可用于马桑中毒的快速检测。

参考文献:

[1] Wang H L. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2015, 11(4): 92
王会礼. 亚太传统医药, 2015, 11(4): 92

[2] Xie L J, Ding M B, Sun C Y. *Adverse Drug Reactions Journal*, 2008, 10(6): 429
谢立璟, 丁茂柏, 孙承业. 药物不良反应杂志, 2008, 10(6): 429

[3] Zhao M, Peng J. *Guizhou Medical Journal*, 2014, 38(12): 1109
赵敏, 彭静. 贵州医药, 2014, 38(12): 1109

[4] Li Y, Liu W Q. *Journal of Pediatric Pharmacy*, 2014, 20(6): I
李勇, 刘万琼. 儿科药学杂志, 2014, 20(6): I

[5] Zhou H X. *For All Health*, 2014, 8(4): 398
周慧仙. 大家健康, 2014, 8(4): 398

[6] Gong M, transl. *Apiculture of China*, 1992, 43(4): 43
龚蜜, 译. 中国蜂业, 1992, 43(4): 43

[7] Xie W W, transl. *Apiculture of China*, 2012, 63(7): 57
谢文闻, 译. 中国蜂业, 2012, 63(7): 57

[8] Fields B A, Reeve J, Bartholomaeus A, et al. *Food Chem Toxicol*, 2014, 72: 234

[9] Beasley M, Hood D, Anderson P, et al. *N Z Med J*, 2018, 131(1473): 59

[10] Kinoshita T, Itaki N, Hikita M, et al. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(8): 1040

[11] Wei H, Zeng F J, Lu M Y, et al. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1998, 33(9): 688
韦宏, 曾凡健, 陆敏仪, 等. 药学报, 1998, 33(9): 688

[12] Kang K, Zhao Y R, Zhou L. *World Latest Medicine Information (Electronic Version)*, 2017, 17(12): 104
康凯, 赵月然, 周凌. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(12): 104

[13] Wu C Y, Zhang G D. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1984, 19(1): 56
伍朝笈, 章观德. 药学报, 1984, 19(1): 56

[14] Yin Y, Chen H L, Chen L, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2015, 33(7): 711
殷耀, 陈惠兰, 陈磊, 等. 色谱, 2015, 33(7): 711

[15] Zhang X Y, Cai X X. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 39(12): 1917
张秀尧, 蔡欣欣. 分析化学, 2011, 39(12): 1917

[16] Matuszewski B K, Constanzer M L, Chavez-Eng C M. *Anal Chem*, 2003, 75(13): 3019