



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108614052 A

(43)申请公布日 2018.10.02

(21)申请号 201810950849.3

(22)申请日 2018.08.21

(71)申请人 湖南农业大学

地址 410128 湖南省长沙市芙蓉区农大路1号

(72)发明人 刘兆颖 刘莎莎 孙志良 杨昆

(74)专利代理机构 长沙市融智专利事务所

43114

代理人 张伟 魏娟

(51) Int. Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

G01N 30/86(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

基于二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法,其包括以下步骤:1)将生物样本进行前处理,得到待测溶液;2)待测溶液进样2D-LC-UV系统进行检测;3)检测结果进行定量分析。该方法样品前处理简单,检测灵敏度比一般色谱高,且能有效排除假阳性,仪器稳定性高等优点,适用于各种生物样品(血、尿、肌肉)中钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的定性定量检测,也适用于体外样品和可疑物证的检验。

1. 基于二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法,其特征在于:包括以下步骤:

- 1) 将生物样本进行前处理,得到待测溶液;
- 2) 待测溶液进样2D-LC-UV系统进行检测;
- 3) 检测结果进行定量分析。

2. 根据权利要求1所述的基于二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法,其特征在于:所述生物样本包括血浆样本、尿液样本及组织样本。

3. 根据权利要求2所述的基于二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法,其特征在于:所述血浆样本进行前处理的方法:将血浆样本按体积比3~5:10加入甲醇/乙腈混合溶液中震荡,涡旋20~40s,离心,取上清液;其中,甲醇/乙腈混合溶液中 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{乙腈}}=20:75\sim85$ 。

4. 根据权利要求2所述的基于二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法,其特征在于:所述尿液样本进行前处理方法:尿液样本进行离心,过0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜,取上清液。

5. 根据权利要求2所述的基于二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法,其特征在于:所述肌肉组织样本进行前处理方法:将肌肉组织搅碎后,按1g/3~5mL加入生理盐水中浸泡,再加入乙腈,乙腈相对加入量为8~12mL每克肌肉组织,超声20~40min,离心,取上清液。

6. 根据权利要求1~5任一项所述的基于二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法,其特征在于:

色谱柱:

一维柱为ASTON SXI 3.5\*25mm\*5 $\mu\text{m}$ 柱,捕集柱为ASTON SN 4.6\*10mm\*5 $\mu\text{m}$ 柱,二维柱为ASTON BPR2 4.6\*10mm\*5 $\mu\text{m}$ 柱;

进样体积100~500 $\mu\text{L}$ ;

流速:0.8~1.2mL/min;

流动相:

A泵:A相为乙腈/水混合溶液, $V_{\text{乙腈}}/V_{\text{水}}=80:20$ ;B相为采用氨水调pH至7.5的10mM磷酸二氢铵溶液;C相为采用磷酸调节pH至3.0的10mM的磷酸二氢铵溶液;D相为甲醇/水混合溶液, $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{水}}=80:20$ ;

B泵:水;

C泵:乙腈:水:采用氨水调pH至7.5的10mM磷酸二氢铵溶液,三者的体积比为56:14:30;

UV检测器:ch1 254nm;ch2 263nm;

柱温:40 $^{\circ}\text{C}$ 。

## 基于二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法

### 技术领域

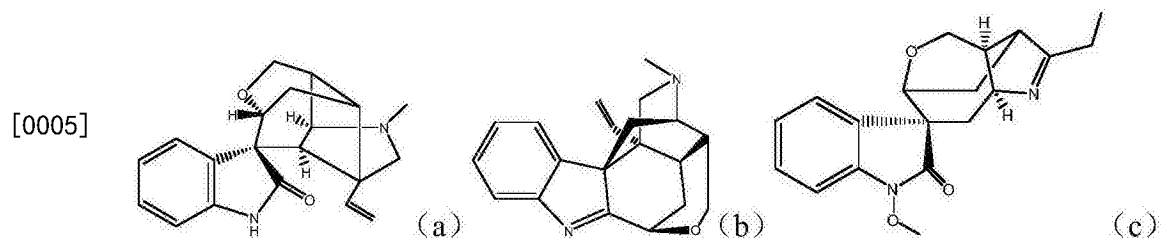
[0001] 本发明涉及一种检测方法,具体涉及一种利用二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法,属于分析技术领域。

### 背景技术

[0002] 钩吻为马钱科胡蔓藤属植物,又名胡蔓藤、断肠草大茶药、野葛等,钩吻属木质藤本,叶卵状长圆形,花呈黄色,排成腋生的花束或顶生,种子有翅,药用其根茎叶。性温味辛、苦、有大毒。药用钩吻分为两种,一种是北美钩吻(*G. sempervirens* Ait),产于美洲;另一种是中国钩吻(*Gelsemium elegans* Benth.),产于亚洲,主要分布在我国浙江、福建、广东、广西、湖南、贵州、云南等地。在钩吻中主要有生物碱,环烯醚萜和大量次生代谢物类的其他化合物。其中提取的生物碱,由于复杂的结构特征和多种生物学效应而引起了广泛关注。据报道,粗生物碱提取物的肠胃外溶液在临床研究或体内显示出镇痛和抗炎作用,以及体外抗肿瘤作用肝微粒体抗肿瘤。钩吻生物碱的主要毒性成分为钩吻素子、钩吻素己、钩吻素卵等。其作用性质与北美钩吻中所含生物碱钩吻素甲、钩吻素乙相似,但毒力稍逊。

[0003] 基于以往的研究,钩吻素甲具有明显的麻醉和镇痛作用,而且素甲也可作为抗抑郁药和抗焦虑药以及神经保护和抗肿瘤药物。钩吻素子是钩吻生物碱中含量最高的假吲哚型生物碱,但与其他生物碱相比,素子的毒性相对较低。它具有多种药理学性质,包括抗肿瘤,镇痛和抗焦虑活性。钩吻素己则是已知国产中毒性最强的钩吻生物碱。陈卫琳等采用HPLC分别测定闽产钩吻根茎叶中钩吻碱甲和钩吻素子及胡蔓藤碱甲生物含量时,定量限仅为0.012mg/mL,且分析时间需要30-50min,目前,丘宏强等人建立HPLC法测定人血浆中钩吻素甲和钩吻素子的浓度,Lin Wang利用UPLC-MS/MS同时测定大鼠血浆中钩吻素甲和钩吻素子的含量,及杨昆等利用LC-MS/MS同时测定血浆中钩吻素甲和钩吻素子,钩吻素己的研究,但由于血浆中钩吻生物碱纯化复杂,前处理操作繁琐,需要选择内标进行标定。且目前尚未有关于用二维液相色谱在生物检材(血,尿,组织)中同时测定三种钩吻生物碱的研究应用。

[0004] 钩吻素甲(a),钩吻素子(b),钩吻素己(c)结构式如下分子结构:



### 发明内容

[0006] 针对现有的检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子及钩吻素己等的方法存在的缺陷,本发明的目的是在于提供一种利用二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法,该方法样品前处理简单,检测灵敏度比一般色谱高,且能有效排除

假阳性,仪器稳定性高等优点,适用于各种生物样品(血、尿、肌肉)中钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的定性定量检测,也适用于体外样品和可疑物证的检验。

[0007] 为了实现上述技术目的,本发明提供了一种基于二维液相色谱同时检测生物样本中钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法,其包括以下步骤:

[0008] 1) 将生物样本进行前处理,得到待测溶液;

[0009] 2) 待测溶液进样2D-LC-UV系统进行检测;

[0010] 3) 检测结果进行定量分析。

[0011] 优选的方案,所述生物样本包括血浆样本、尿液样本及组织样本。

[0012] 较优选的方案,所述血浆样本进行前处理的方法:将血浆样本按体积比3~5:10加入甲醇/乙腈混合溶液中震荡,涡旋20~40s,离心,取上清液;其中,甲醇/乙腈混合溶液中V甲醇/V乙腈=20:75~85。进一步优选的血浆样本前处理方法:将血浆样本按体积比4:10加入甲醇/乙腈混合溶液中震荡,涡旋30s,离心,取上清液;其中,甲醇/乙腈混合溶液中V甲醇/V乙腈=20:80。

[0013] 较优选的方案,所述尿液样本进行前处理方法:尿液样本进行离心,过0.22 $\mu$ m滤膜,取上清液。

[0014] 较优选的方案,所述肌肉组织样本进行前处理方法:将肌肉组织搅碎后,按1g/3~5mL加入生理盐水中浸泡,再加入乙腈,乙腈相对加入量为8~12mL每克肌肉组织,超声20~40min,离心,取上清液。进一步优选的方案,肌肉组织样本前处理方法:将肌肉组织搅碎后,按1g/4mL加入生理盐水中浸泡,再加入乙腈,乙腈相对加入量为10mL每克肌肉组织,涡旋30min,反复冻融三次,离心,取上清液。

[0015] 优选的方案,色谱柱:一维柱为ASTON SXI 3.5\*25mm\*5 $\mu$ m柱(离子交换色谱柱,分析柱),捕集柱为ASTON SN 4.6\*10mm\*5 $\mu$ m柱(反相色谱柱,中间柱),二维柱为ASTON BPR2 4.6\*10mm\*5 $\mu$ m柱(反相色谱柱,分析柱)。

[0016] 进样体积100~500 $\mu$ L;

[0017] 流速:0.8~1.2mL/min;

[0018] 流动相:

[0019] A泵:A相为乙腈/水混合溶液,V乙腈/V水=80:20;B相为采用氨水调pH至7.5的10mM磷酸二氢铵溶液;C相为采用磷酸调节pH至3.0的10mM的磷酸二氢铵溶液;D相为甲醇/水混合溶液,V甲醇/V水=80:20;

[0020] B泵:水;

[0021] C泵:乙腈:水:采用氨水调pH至7.5的10mM磷酸二氢铵溶液,三者的体积比为56:14:30。

[0022] UV检测器:ch1 254nm;ch2 263nm;

[0023] 柱温:40 $^{\circ}$ C。

[0024] 本发明的基于二维液相色谱同时测定钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法,其包括如下步骤:

[0025] a) 样品前处理:

[0026] 取血浆样本(猪血浆、大鼠血浆或羊血浆等)400 $\mu$ L,置于加有1000 $\mu$ L甲醇-乙腈(20:80)处理液的离心管中,震荡涡旋30s,13000rpm下离心10min,取上清液备用;

[0027] 取尿液样本1mL,置于1.5mL离心管中,13000rpm下离心10min,过0.22 $\mu$ m滤膜,取上清液备用;

[0028] 将肌肉组织搅碎,称取1g样品,将肌肉组织搅碎后,取1g加入4mL超纯水,然后加入10mL乙腈,超声混匀后,离心,取上清液备用;

[0029] b) 将步骤a)中制备的样品配制成四个质控品,取配好的质控品1.0mL加入液相瓶中,另配制无污染的样本作空白对照,空白和每个浓度梯度均设六个重复;猪血浆质控品LOQ、低、中、高浓度分别为(0.02、0.05、0.5、5.0 $\mu$ g/mL);大鼠血浆、羊血浆、组织、尿液质控品LOQ、低、中、高浓度分别为(0.05、0.1、0.5、5.0 $\mu$ g/mL);

[0030] c) 样品检测和分析;

[0031] 取步骤b)的质控品,按液相分析条件,进样,进行液相检测;

[0032] 色谱柱:安莱科公司反相色谱柱;其中,萃取柱(一维柱)为ASTON SXI3.5\*25mm\*5 $\mu$ m柱,中间柱(捕集柱)为ASTON SN 4.6\*10mm\*5 $\mu$ m柱,分析柱(二维柱)为ASTON BPR2 4.6\*10mm\*5 $\mu$ m柱;

[0033] 进样体积100~500 $\mu$ L;流速:1mL/min;

[0034] 流动相:A泵:A-乙腈/水(80:20);B-10mM磷酸二氢铵,氨水调pH至7.5;C-10mM磷酸二氢铵,磷酸调pH至3.0;D-甲醇/水(80:20);

[0035] B泵:纯水;

[0036] C泵:乙腈:水:10mM磷酸二氢铵(氨水调pH至7.5)=(56:14:30);

[0037] UV检测器:ch1 254nm;ch2 263nm;

[0038] 柱温:40 $^{\circ}$ C;

[0039] 检测结果分析:

[0040] 在猪血浆中,进样体积为500 $\mu$ L时,0.02~10 $\mu$ g/mL内线性关系良好( $r^2 > 0.998$ ),最低检测限10ng/mL, $S/N > 3$ ,定量限为20ng/mL, $S/N > 10$ ;方法考察四个质控品中:LOQ、50ng/mL、500ng/mL、5000ng/mL,除了LOQ(20ng/mL)的素己中,回收率只有28%,其余(素甲,素子,素己)回收率均大于88%,RSD值均小于5%。

[0041] 在大鼠和羊血浆中,进样体积为100 $\mu$ L时,0.05~10 $\mu$ g/mL内线性关系良好( $r^2 > 0.996$ ),最低检测限20ng/mL, $S/N > 3$ ,定量限为50ng/mL, $S/N > 10$ ;

[0042] 在组织中,进样体积为500 $\mu$ L时,0.05~10 $\mu$ g/mL内线性关系良好( $r^2 > 0.996$ ),最低检测限25ng/mL, $S/N > 3$ ,定量限为50ng/mL, $S/N > 10$ ;方法考察四个质控品中:LOQ(50ng/mL)、100ng/mL、500ng/mL、5000ng/mL,回收率均除肾脏中素己偏低,其余均大于90%。

[0043] 在尿液中,进样体积为100 $\mu$ L时,0.05~10 $\mu$ g/mL内线性关系良好( $r^2 > 0.994$ ),最低检测限20ng/mL, $S/N > 3$ ,定量限为50ng/mL, $S/N > 10$ 。

[0044] 本发明的基于二维液相色谱同时测定钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己的方法中:

[0045] 标准储备液:用甲醇将钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己配制成100 $\mu$ g/mL的混合标准液,放于-80 $^{\circ}$ C下保存,保质期6个月。

[0046] 质控品溶液:用血浆将钩吻混标稀释成20ng,50ng,500ng,5 $\mu$ g/mL的混合标准液,放于-20 $^{\circ}$ C下保存,保质期3个月。

[0047] 标准曲线工作液:精密吸取储备液溶液,用空白血浆分别稀释,使钩吻混标质量浓度分别为10 $\mu$ g,5 $\mu$ g,1 $\mu$ g,500ng,100ng,50ng,20ng,10ng/mL,置于-20 $^{\circ}$ C待用。

[0048] 本发明利用二维液相色谱检测的原理是以空白样品和添加样品作为对照,按平行操作的要求,对生物样品进行简单前处理后,采用二维液相色谱进行检测,以保留时间,峰面积的紫外双波比例作为定性判断依据;与平行操作的添加标准品响应值比较,根据峰面积之比,用外标法进行定量分析。

[0049] 相对现有技术,本发明的技术方案带来的有益技术效果:

[0050] 本发明所建立的二维色谱方法前处理简单、成本低廉、操作简单,可以去除样品中大部分杂质,可以在线处理500 $\mu$ L样品,不同来源的血浆、组织(肌肉、肾脏、肝脏)中均未发现干扰,目标物在二维系统中转移完全;

[0051] 本发明基于新型二维液相色谱的检测方法分别对六个不同来源的空白猪血浆、尿液、组织进行色谱行为和专属性考察,该方法均未受到内源性和常用药物的干扰。

[0052] 本发明基于新型二维液相色谱的检测方法进行在线处理能力评估,最大进样体积达到500 $\mu$ L时,进样量的增大并未造成色谱峰扭曲或位移。

[0053] 本发明基于新型二维液相色谱的检测方法进行目标化合物转移能力的评估,捕集柱能完全截取一维色谱柱上的目标化合物,并完全转移到二维色谱柱上进一步进行分析。

[0054] 本发明基于新型二维液相色谱的检测方法采用的色谱柱为:萃取柱(一维柱)为ASTON SXI 3.5\*25mm\*5 $\mu$ m离子交换柱,中间柱(捕集柱)为ASTON SN4.6\*10mm\*5 $\mu$ m反相色谱柱,分析柱(二维柱)为ASTON BPR2 4.6\*10mm\*5 $\mu$ m反相色谱柱;而对于以往的检测中,普通反相色谱柱同时分离钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己时,不仅分析时间超过30min,且三个目标化合物重叠,钩吻素己不能得到有效的分离;用2.6 $\mu$ m的phenomenexkinetex反相柱使用令色谱压力升高,目标化合物无法正常分离。

[0055] 本发明基于新型二维液相色谱的检测方法对流动相:对比了乙腈/水;乙腈/甲酸/水;乙腈/10mM乙酸铵等,均不能使钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己有效分离。而此流动相的优化主要体现在水相上,磷酸二氢铵作为水相溶液时,严格控制流动相的pH对于目标化合物的保留和稳定性至关重要,并且峰型得到很好地改善,减少拖尾现象等;并且此方法使用的流动相无需更换梯度比例,仪器平衡时间短,目标化合物15min内即可分离出。

[0056] 本发明基于二维液相色谱检测的方法对样品前处理进行优化,血浆样品比较了有机溶剂沉淀和酸沉淀,最后选择有机溶剂沉淀蛋白一步到位;组织样品比较了4:10的生理盐水/乙腈、4:10的超纯水/乙腈、20倍样品体积的生理盐水,最后选定4:10的生理盐水/乙腈使目标化合物的响应最高;尿液样品比较了直接进样、过0.22 $\mu$ m滤膜进样、离心过膜后进样,最终选定13000rpm下离心10min后过0.22 $\mu$ m滤膜进样以延长萃取柱寿命。

[0057] 本发明基于二维液相色谱检测的方法相比一般的色谱具有更高的灵敏度,能有效的排除假阳性。

[0058] 本发明基于二维液相色谱检测稳定性高。

## 附图说明

[0059] 图1表示空白血浆与样品血浆二维色谱检测图:空白血浆(蓝色)与样品血浆(黑色)二维色谱检测图;其中,a-钩吻素甲;b-钩吻素子;c-钩吻素己。

[0060] 图2表示空白组织与样品组织二维色谱检测图:空白组织(蓝色)与样品组织(黑色)二维色谱检测图;其中,a-钩吻素甲;b-钩吻素子;c-钩吻素己。

[0061] 图3表示空白尿液与样品尿液二维色谱检测图:空白尿液(蓝色)与样品尿液(黑色)二维色谱检测图;其中,a-钩吻素甲;b-钩吻素子;c-钩吻素己。

## 具体实施方式

[0062] 以下实施例旨在进一步说明本发明内容,而不是限制本发明权利要求的保护范围。

[0063] 实施例1

[0064] 定性分析

[0065] 1. 试剂

[0066] a) 水为超纯水;

[0067] b) 磷酸二氢铵为色谱纯;

[0068] c) 甲醇、乙腈、磷酸、氨水均为色谱纯;

[0069] d) 10mM磷酸二氢铵 (pH=3.0):称取1.1503g磷酸二氢铵,至于1000mL容量瓶中,加一级水溶解、稀释至刻度,磷酸调pH至3.0;

[0070] e) 10mM磷酸二氢铵 (pH=7.5):称取1.1503g磷酸二氢铵,至于1000mL容量瓶中,加一级水溶解、稀释至刻度,氨水调pH至7.5;

[0071] 2、标准溶液:

[0072] 1) 钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己标准储备液:精确称取钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己标准品,用甲醇溶解并稀释于容量瓶中,混匀,分别配制成1.0mg/mL钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己标准储备液,放与-80℃下保存,保质期6个月。

[0073] 2) 钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己标准工作液:用甲醇将钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己标准储备液混合配制成100μg/mL的标准工作液,放与-20℃下保存,保质期3个月。试验中所用其它浓度的标准溶液均从上述工作液溶液用甲醇稀释而得,放与-20℃下保存,保质期3个月。

[0074] 2. 仪器与材料

[0075] a) 新型二维液相色谱:配有FLC全自动二维液相色谱耦合仪,湖南德米特仪器有限公司;LC-20AT溶液输送单元;DGU-20A5R脱气单元;SPD-20AUV-VIS检测器;CBM-20A控制器;LabSolutionsLC Workstation Ver.5Single LC工作站,日本岛津公司

[0076] b) 电子天平,感量0.1mg,SHIMADZU,日本岛津公司;

[0077] c) 高速离心机;

[0078] d) 振荡器;

[0079] e) 移液器:量程10μL-100μL,100μL-1000μL;

[0080] f) pH计;

[0081] 3. 样品前处理

[0082] 取血液等液体样本200-400μL或组织样本1.0g-2.0g搅碎与试管中。

[0083] 另取2份相同基质的空白样本,1份作为空白样本,1份添加钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己混合标准液,制备添加样本,混匀。

[0084] 3.1 血液样品

[0085] 取血浆样本400μL放置1.5mL离心管中,加1000μL甲醇-乙腈(80:20)处理液,震荡

涡旋,13000r/min离心10min,取上清液进样2D-LC-UV分析;

[0086] 3.2尿液样品

[0087] 取得尿液,13000r/min离心10min,过0.22 $\mu$ m滤膜,取上清液进2D-LC-UV分析;

[0088] 3.3组织样品

[0089] 肌肉、肝、肾搅碎后,取1g加入4mL超纯水,然后加入10mL乙腈,超声混匀后,13000r/min离心10min,取上清液进2D-LC-UV分析。

[0090] 4. 仪器检测

[0091] 新型二维液相色谱条件

[0092] 以下为参考条件,可根据不同品牌仪器和不同样品等实际情况进行调整;

[0093] 色谱柱:萃取柱(一维柱)为ASTON SXI 3.5\*25mm\*5 $\mu$ m柱,中间柱(捕集柱)为ASTON SN 4.6\*10mm\*5 $\mu$ m柱,分析柱(二维柱)为ASTON BPR2 4.6\*10mm\*5 $\mu$ m柱;

[0094] 流动相及洗脱条件;

[0095] 流动相:a-乙腈/水(80:20);b-10mM磷酸二氢铵,氨水调PH至7.5;c-10mM磷酸二氢铵,磷酸调PH至3.0;

[0096] A泵:a:b:c=25:13:62,等度洗脱;

[0097] B泵:纯水;

[0098] C泵:a:b(70:30),等度洗脱;

[0099] 进样量:200-500 $\mu$ L;

[0100] 紫外波长:ch1 254nm;ch2 263nm;

[0101] 时间程序见下表:

[0102] 钩吻素子、钩吻素甲、钩吻素己血液中FIC系统运行时间程序



[0103]

Time program setting					
t/min	0.00-1.0	1.00-1.60	1.61-4.00	4.01-4.5	4.50-15.00
TRS status	The first dimension column is disconnected from the trapping column	The first dimension column is disconnected from the trapping column	The first dimension column is connected to the trapping column	The trapping column is connected to the second dimension column	The trapping column is disconnected from the second dimension column
Mam function	Complete sample on-line enrichment	Perform the first dimension chromatographic separation	The target component is transferred to the trapping column	The target component is transferred to two-dimensional column	The further two-dimensional separation of target components

[0104] 5. 记录和计算

[0105] 记录各样品及标准品平行进样三次中目标物的保留时间及峰面积值,按下例公式计算回收率:

$$[0106] \quad R = \frac{\bar{A}}{A_{12}} \times 100\%$$

[0107] 式中:

[0108] R-回收率;

[0109]  $\bar{A}$ -样品添加标准品后,前处理获得的峰面积平均值;[0110]  $A_{12}$ -样品前处理后,添加相同浓度标准品获得的峰面积平均值;

[0111] 6. 定性结果评价

[0112] 6.1 阴性结果评价

[0113] 如果空白样品未出现与标准品 $R_t$ 值(保留时间)相同的色谱峰,且添加样品相应目标物的回收率在60%以上,则阴性结果可靠。

[0114] 如果添加样品中未出现与标准品 $R_t$ 值相同的色谱峰或回收率低于60%,则阴性结果不可靠。

[0115] 如果添加样品的添加含量 $\leq 0.02\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可不计算回收率,则阴性结果按以下方式评价:

[0116] 如果空白样品未出现与标准品 $R_t$ 值相同的色谱峰,且添加样品的色谱峰信噪比大于10,则阴性结果可靠。

[0117] 如果添加样品中未出现与标准品 $R_t$ 值相同的色谱峰或添加样品的色谱峰的信噪

比  $\leq 10$ , 则阴性结果不可靠。

[0118] 6.2 阳性结果评价

[0119] 如果样品中出现与目标物相同的色谱峰, 且目标峰的双波长 (两个紫外波长下的峰面积) 比值与添加样品中的双波长比值误差在  $\pm 5\%$  之内, 色谱峰保留时间与添加样品中目标物的色谱峰保留时间比较, 相对误差在  $\pm 2.5\%$  之内, 空白样品中未出现相应的色谱峰, 则阳性结果可靠。

[0120] 如果空白样品中出现与添加样品中目标物保留时间一致的色谱峰, 且双波长比值一致, 则阳性结果不可靠。

[0121] 本发明中钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己在血样中的检出限为  $20\text{ng/mL}$ 。

[0122] 本发明中钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己在组织中的检出限为  $50\text{ng/mL}$ 。

[0123] 本发明中钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己在尿液中的检出限为  $20\text{ng/mL}$ 。

[0124] 实施例2

[0125] 定量分析

[0126] 1. 试剂同实施例1

[0127] 2. 仪器与材料同实施例1

[0128] 3. 样品萃取

[0129] 4. 准确量取案件样品  $200\text{--}400\mu\text{L}$  或  $1.0\text{g}\sim 2.0\text{g}$  搅碎与试管中平行2份。另取1份相同基质的空白样本, 添加钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己混合标准液, 制备添加样本, 平行6份, 混匀。其他同实施例1。

[0130] 5. 记录和计算

[0131] 记录相对标准偏差, 用以下公式表示:

$$[0132] \quad P_{tr} = \sqrt{\frac{\sum(A_i - \bar{A})^2}{n-1}} \times \frac{1}{\bar{A}} \times 100\%$$

[0133] 式中:

[0134]  $P_{tr}$ -相对标准偏差;

[0135]  $\bar{A}$ -添加峰面积平均值;

[0136]  $A_i$ 表示第*n*次获得的峰面积 ( $i = 1, 2, 3, \dots, 6$ );

[0137] 6. 定量结果评价

[0138] 如果添加样品中目标物含量的  $RSD > 5\%$ , 定量数据不可靠。如果目标物含量的  $RSD \leq 5\%$ , 定量数据可靠。其含量按两份案件样品的平均值计算。

[0139] 实施例3

[0140] 利用血液对本发明的方法进行评价

[0141] 1. 试剂同实施例1;

[0142] 2. 仪器与材料同实施例1;

[0143] 3. 样品萃取

[0144] 取空白的非新鲜血液  $400\text{mL}$  于试管中, 添加钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素

[0145] 己的混合标准品制备成添加样品, 混匀。

[0146] 上述样品中加  $1000\mu\text{L}$  甲醇-乙腈 (80:20) 处理液, 震荡涡旋,  $13000\text{r/min}$

- [0147] 离心10min,猪血样取上清液500μL(大鼠及羊取100μL)进样2D-LC-UV
- [0148] 分析;
- [0149] 4. 仪器检测
- [0150] 新型二维液相色谱条件
- [0151] 以下为参考条件,可根据不同品牌仪器和不同样品等实际情况进行调整;
- [0152] 色谱柱:萃取柱(一维柱)为ASTON SXI 3.5\*25mm\*5μm柱,中间柱(捕集柱)为ASTON SN 4.6\*10mm\*5μm柱,分析柱(二维柱)为ASTON BPR2 4.6\*10mm\*5μm柱;
- [0153] 流动相及洗脱条件;
- [0154] 流动相:a-乙腈/水(80:20);b-10mM磷酸二氢铵,氨水调pH至7.5;c-10mM磷酸二氢铵,磷酸调pH至3.0;
- [0155] A泵:a:b:c=25:13:62,等度洗脱;
- [0156] B泵:纯水;
- [0157] C泵:a:b(70:30),等度洗脱;
- [0158] 进样量:500μL;
- [0159] 紫外波长:ch1 254nm;ch2 263nm;
- [0160] 时间程序见下表:
- [0161] 钩吻素子、钩吻素甲、钩吻素己血液中FIC系统运行时间程序
- [0162]

Time program setting					
t/min	0.00-1.0	1.00-1.60	1.61-4.00	4.01-4.5	4.50-15.00
TRS	The first	The first dimension	The first	The trapping	The trapping
status	dimension	column is	dimension	column is	column is
	column is	disconnected from	column is	connected to the	disconnected from
	disconnected	the trapping column	connected to	second dimension	the second
	from the		the trapping	column	dimension column
	trapping column		column		
Man	Complete	Perform the first	The target	The target	The further
function	sample on-line	dimension	component is	component is	two-dimensional
	enrichment	chromatographic	transferred to	transferred to	separation of target
		separation	the trapping	two-dimensional	components
			column	column	

[0163] 本实施例中,血浆中添加浓度为20ng/mL时,钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的回收率分别为96.19%±0.06、91.52%±0.03、28.31%±0.03;

[0164] 本实施例中,血浆中添加浓度为50ng/mL时,钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的回收

率分别为92.35%±0.02、93.74%±0.03、88.45%±0.03；

[0165] 本实施例中，血浆中添加浓度为500ng/mL时，钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的回收率分别为91.30%±0.01、91.91%±0.01、91.60%±0.01；

[0166] 本实施例中，血浆中添加浓度为5000ng/mL时，钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的回收率分别为89.90%±0.01、90.07%±0.01、89.75%±0.01；

[0167] 本实施例中，血浆中添加浓度为20ng/mL时，钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的RSD% (日内) 分别为4.93、4.36、1.06，RSD% (日间) 分别为3.21、2.78、3.37；

[0168] 本实施例中，血浆中添加浓度为50ng/mL时，钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的RSD% (日内) 分别为0.64、1.11、2.57，RSD% (日间) 分别为1.73、3.21、1.81；

[0169] 本实施例中，血浆中添加浓度为500ng/mL时，钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的RSD% (日内) 分别为2.22、2.19、2.51，RSD% (日间) 分别为2.12、2.27、2.37；

[0170] 本实施例中，血浆中添加浓度为5000ng/mL时，钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的RSD% (日内) 分别为1.63、1.56、1.16，RSD% (日间) 分别为1.53、1.56、1.16；

[0171] 本实施例中，猪血浆中的钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己在10-10000ng/mL浓度范围内均有着良好的线性关系；该方法最小定量限为20ng/mL，信噪比>10；最小检出限为10ng/mL，信噪比>3；

[0172] 本实施例中，大鼠及羊血浆中的钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己在20-10000ng/mL浓度范围内均有着良好的线性关系；该方法最小定量限为50ng/mL，信噪比>10；最小检出限为20ng/mL，信噪比>3。

[0173] 实施例4

[0174] 利用组织对本发明的方法进行评价

[0175] 1. 试剂同实施例1；

[0176] 2. 仪器与材料同实施例1；

[0177] 3. 样品萃取

[0178] 组织包括肌肉、肾、肝，样品搅碎后，取1g于装有4mL生理盐水的试管中，添加钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的混合标准品制备成添加样品，混匀。

[0179] 上述样品中加10mL乙腈处理液，超声混匀30min，13000r/min离心10min，取上清液500μL进样2D-LC-UV分析；

[0180] 4. 仪器检测

[0181] 新型二维液相色谱条件

[0182] 以下为参考条件，可根据不同品牌仪器和不同样品等实际情况进行调整；

[0183] 色谱柱：萃取柱（一维柱）为ASTON SXI 3.5\*25mm\*5μm柱，中间柱（捕集柱）为ASTON SN 4.6\*10mm\*5μm柱，分析柱（二维柱）为ASTON BPR2 4.6\*10mm\*5μm柱；

[0184] 流动相及洗脱条件；

[0185] 流动相：a-乙腈/水（80:20）；b-10mM磷酸二氢铵，氨水调pH至7.5；c-10mM磷酸二氢铵，磷酸调pH至3.0；

[0186] A泵：a:b:c=25:13:62，等度洗脱；

[0187] B泵：纯水；

[0188] C泵：a:b（70:30），等度洗脱；

- [0189] 进样量:500 $\mu$ L;  
 [0190] 紫外波长:ch1 254nm;ch2 263nm;  
 [0191] 时间程序见下表:  
 [0192] 钩吻素子、钩吻素甲、钩吻素己组织中FIC系统运行时间程序  
 [0193]

t/min	Time program setting				
	0.00-1.0	1.00-1.50	1.51-3.50	3.51-4.2	4.20-15.00
TRS	The first	The first dimension	The first	The trapping	The trapping
status	dimension	column is	dimension	column is	column is
	column is	disconnected from	column is	connected to the	disconnected from
	disconnected	the trapping column	connected to	second dimension	the second
	from the		the trapping	column	dimension column
	trapping column		column		
Mam	Complete	Perform the first	The target	The target	The further
function	sample on-line	dimension	component is	component is	two-dimensional
	enrichment	chromatographie	transferred to	transferred to	separation of target
		separation	the trapping	two-dimensional	components
			column	column	

[0194] 本实施例中,在组织中(肌肉,肝脏,肾脏)的方法考察四个质控品中:LOQ(50ng/mL)、100ng/mL、500ng/mL、5000ng/mL,回收率均除肾脏中素己偏低,其余均在80%~120%范围之内;

[0195] 本实施例中,组织中(肌肉,肝脏,肾脏)钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己在25~10000ng/mL浓度范围内均有着良好的线性关系;该方法最小定量限为50ng/mL,信噪比>10;最小检出限为25ng/mL,信噪比>3;

[0196] 实施例5

[0197] 利用尿液对本发明的方法进行评价

[0198] 1.试剂同实施例1;

[0199] 2.仪器与材料同实施例1;

[0200] 3.样品萃取

[0201] 取空白的非新鲜尿液于试管中,添加钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的混合标准品制备成添加样品,混匀。

[0202] 上述样品13000r/min离心10min,过0.22 $\mu$ m滤膜,取100 $\mu$ L进样2D-LC-UV分析;

[0203] 4.仪器检测

[0204] 新型二维液相色谱条件

- [0205] 以下为参考条件,可根据不同品牌仪器和不同样品等实际情况进行调整;
- [0206] 色谱柱:萃取柱(一维柱)为ASTON SXI 3.5\*25mm\*5μm柱,中间柱(捕集柱)为ASTON SN 4.6\*10mm\*5μm柱,分析柱(二维柱)为ASTON BPR2 4.6\*10mm\*5μm柱;
- [0207] 流动相及洗脱条件;
- [0208] 流动相:a-乙腈/水(80:20);b-10mM磷酸二氢铵,氨水调PH至7.5;c-10mM磷酸二氢铵,磷酸调PH至3.0;
- [0209] A泵:a:b:c=25:13:62,等度洗脱;
- [0210] B泵:纯水;
- [0211] C泵:a:b(70:30),等度洗脱;
- [0212] 进样量:100μL;
- [0213] 紫外波长:ch1 254nm;ch2 263nm;
- [0214] 时间程序见下表:
- [0215] 钩吻素子、钩吻素甲、钩吻素己尿液中FIC系统运行时间程序
- [0216]

		Time program setting				
t/min		0.00-1.0	1.00-1.20	1.21-2.80	2.81-3.5	3.50-15.00
TRS	The first	The first dimension	The first	The trapping	The trapping	
status	dimension	column is	dimension	column is	column is	
	column is	disconnected from	column is	connected to the	disconnected from	
	disconnected	the trapping column	connected to	second dimension	the second	
	from the		the trapping	column	dimension column	
	trapping column		column			
Mam	Complete	Perform the first	The target	The target	The further	
function	sample on-line	dimension	component is	component is	two-dimensional	
	enrichment	chromatographie	transferred to	transferred to	separation of target	
		separation	the trapping	two-dimensional	components	
			column	column		

[0217] 本实施例中,尿液中钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己在20~10000ng/mL浓度范围内均有着良好的线性关系;该方法最小定量限为50ng/mL,信噪比>10;最小检出限为20ng/mL,信噪比>3。

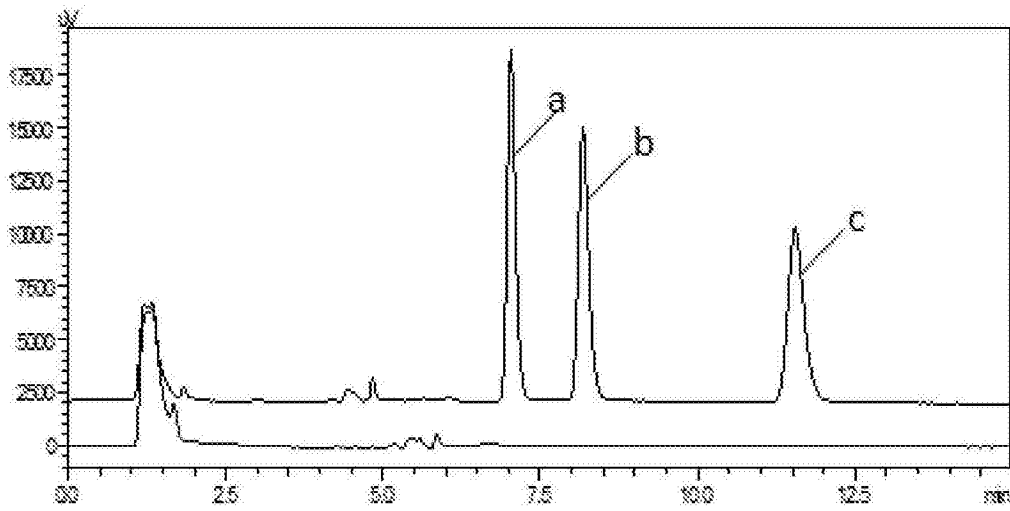


图1

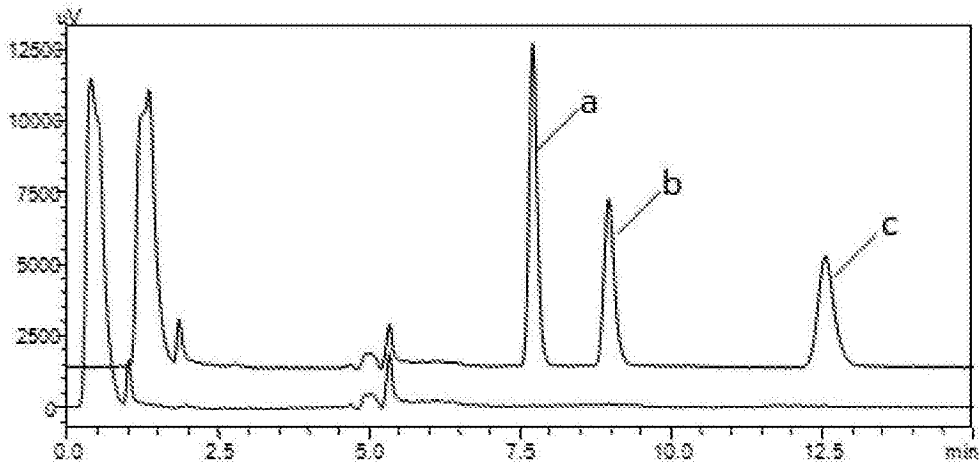


图2

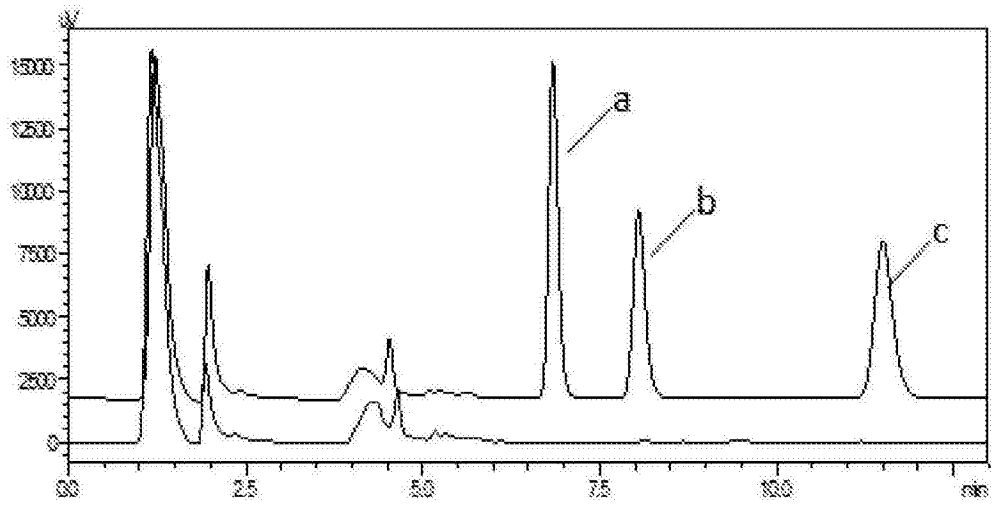


图3