

• 论 著 •

紫外分光光度法测定秋水仙碱中毒血清的临床应用

刘军生¹, 王淑萍², 杜书明^{2△}

(1. 中国人民解放军第二五四医院, 天津 300142; 2. 武警后勤学院附属医院, 天津 300260)

摘要:目的 探讨紫外分光光度法测定秋水仙碱中毒血清, 为临床秋水仙碱中毒提供诊疗依据。方法 取 0.5 μL 血清加提取液(三氯甲烷:甲醇=95:5)4.0 μL。充分震荡萃取, 高速离心, 取有机层于另一试管中氮气吹干, 取 0.2 μL 甲醇溶解残渣, 混匀, 取 50 μL 做紫外扫描。结果 血清中秋水仙碱最大吸收峰(351±1)nm, 浓度在 5.0~40 μg/μL 范围内呈线性, 回归方程 $Y=0.050 2X+0.001 3$, 其相关系数为 0.999 5, 回收率为 83.8%~102.8%, 相对标准差为 3.3%~4.8%。日内、日间相对标准差分别为 3.22%~4.74% 和 3.45%~4.66%, 最低检出浓度为 1.0 μg/μL。结论 该方法操作简便, 分析快速, 结果准确, 为临床诊断秋水仙碱中毒提供了一个简便准确的检测方法。

关键词:秋水仙碱; 中毒; 血清; 紫外分光光度法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.01.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)01-0037-02

Clinical application of ultraviolet spectrophotometric method in detection of colchicine poisoning serum

Liu Junsheng¹, Wang Shuping², Du Shuming²

(1. 254 Hospital of PLA, Tianjin 300142, China; 2. Affiliated Hospital of Armed Police Logistics College, Tianjin 300260, China)

Abstract: Objective To explore the application of the ultraviolet spectrophotometry method in detecting colchicine poisoning serum to provide the basis for clinical diagnosis and treatment of colchicine poisoning. **Methods** 0.5 μL of serum was taken and added with the extract solution(chloroform:methanol=95:5) 4.0 μL. The sufficient oscillation extraction and high-speed centrifugation were performed. Then the organic layer was taken into another test tube for drying by nitrogen. 0.2 μL of methanol dissolved residue was taken and blended. 50 μL of the mixed solution was taken for conducting ultraviolet scanning. **Results** The maximum absorption peak of serum colchicine was (351±1) nm, the concentration within 5.0~40 μg/μL showed linearity, the regression equation was $Y=0.050 2X+0.001 3$, the correlation coefficient was 0.999 5, the recovery rate was 83.8%~102.8%, the relative standard deviation; 3.3%~4.8%. The intra-day and inter-day were 3.22%~4.74% and 3.45%~4.66%, the lowest detection concentration was 1.0 μg/μL. **Conclusion** This method is simple to operate, fast in analysis, accurate in the detection result, which provides a simple and accurate detection method for clinical diagnosis of colchicine poisoning.

Key words: colchicines; poisoning; serum; UV spectrophotometry

秋水仙碱(又名秋水仙素)是从百合科植物秋水仙中提取的一种生物碱,对急性痛风性关节炎有选择性抗炎作用,为高效的抗痛风药。因秋水仙碱在体内可代谢成具有极强毒性的二秋水仙碱,超剂量或长期服用即可导致中毒。若有明确的服药史,或者吃过含秋水仙碱的鲜黄花菜,诊断并不困难^[1]。对于不明原因的胃肠道疾病及电解质紊乱,则需要与细菌性痢疾、胃肠炎进行鉴别,鉴别的最好方法就是做毒物分析。秋水仙碱中毒严重时可并发多脏器功能不全综合征,如血尿、血小板减少和再生障碍性贫血等^[2-6]。笔者根据参考文献^[7-9],研究了中毒患者血清中秋水仙碱的萃取和水平测定,可为临床快速筛选和诊断秋水仙碱中毒提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 鲜黄花菜集体中毒或者秋水仙碱药物中毒患者的血清,来源于医院急诊科和重症监护病房(ICU)。

1.2 仪器与试剂 UV-2600 双光速紫外/可见分光光度计、50 μL 微量比色池由上海天美科学仪器有限公司提供;LG16-B 高速离心机由北京雷勃尔离心机有限公司提供;SK-1 型快速混匀器由常州国华电器有限公司提供。纯度为不小于 95% 的秋水仙碱标准品由上海宇涵生物科技有限公司提供,甲醇批号为 130905,三氯甲烷批号为 20131107。

1.3 方法 取带盖塑料试管标注 V 和 B, V 管加患者血清 0.5 μL, B 管加健康人混合血清 0.5 μL, 然后两管各加提取液 4.0 μL, 用 SK-1 型快速混匀器混匀后, 静置 5 min, 然后以 10 000 r/min 高速离心 10 min, 取有机层氮气吹干, 加甲醇 0.2 μL, 混匀。秋水仙碱分子结构中的共轭体系在紫外光区 350 nm 处有特征吸收峰, 吸光度的大小与溶液的浓度成正比。因此, 选择 200~500 nm 波长, 空白管萃取液 50 μL 做基线测量, 然后再扫描 V 管萃取液, 根据(352±1)nm 处的最大吸收峰进行定性, 根据标准曲线或回归方程求出患者血清中的秋水仙碱水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行统计处理, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 秋水仙碱最大吸收峰确定 配制 10、20、30 μg/μL 的秋水仙碱甲醇溶液, 以无水甲醇做空白测量基线, 进行紫外扫描。不同浓度的秋水仙碱在(352±1)nm 处有最大吸收峰。因此血清秋水仙碱测定应选定(351±1)nm 为检测波长。

2.2 空白试验 取健康人混合血清 0.5 mL 分别加入 3 个带盖的塑料试管中, 用其中 1 份萃取液 50 μL 做基线测量, 然后再扫描其它 2 份空白萃取液。结果(351±1)nm 处无吸收峰。

空白试验表明如果在(351±1)nm 处出现最大吸收峰,结合临床,应考虑血清中有秋水仙碱成分的存在。

2.3 工作曲线的绘制 用甲醇配制 1.0 mg/μL 秋水仙碱标准贮备溶液。取配制好的 1.0 mg/μL 秋水仙碱标准贮备液,用健康人混合血清逐级稀释为 40、20、10、5、1、0.5、0 μg/μL 的秋水仙碱应用液,分别取 0.5 μL 加入 7 个带盖的 5.0 μL 塑料试管中。然后各加提取液(三氯甲烷:甲醇=95:5)4.0 μL 于 SK-1 型快速混匀器,充分震荡萃取,静置 5 min,然后以 10 000 r/min 高速离心 10 min,取有机层氮气吹干,加 0.2 μL 甲醇,混匀。设定扫描波长范围为 200~500 nm。取空白管萃取液 50 μL 做基线测量,然后再扫描不同浓度的秋水仙碱标准工作液,秋水仙碱最大吸收峰为(352±1)nm。按上述操作方法做 5 次平行试验,根据在(352±1)nm 处测定的平均吸光度值(Y)对秋水仙碱质量浓度(X)进行回归,得线性回归方程 $Y=0.0502X+0.0013$,相关系数 $r=0.9995$,线性范围为 5.0~60 μg/μL,本法测定秋水仙碱最低检出浓度为 1.0 μg/μL。

2.4 回收率试验 采用加入回收法,用健康人混合血清配制浓度分别为 30、20、10、0 μg/μL 的秋水仙碱血清样品,各取 0.5 μL 于带盖塑料试管中,扫描不同浓度的秋水仙碱萃取液,根据(352±1)nm 处的最大吸收峰进行定性,查标准曲线或回归方程求出秋水仙碱水平。结果经统计学处理,方法回收率为 83.8%~102.8%,相对标准差为 3.3%~4.8%。

2.5 精密度试验 用健康人混合血清配制浓度分别为 40、30、20、15、0 μg/μL 的秋水仙碱样品。萃取血清,紫外分光光度法进行扫描测定。各浓度样品分别在日内测定 5 次,然后 4℃ 冰箱保存,并隔日对每个浓度样品连续测定 5 次。分别计算日内与日间相对标准差,结果见表 1。

表 1 血清中秋水仙碱浓度的精密度试验结果

秋水仙碱浓度 (μg/μL)	日内			日间		
	均数	标准差	相对标准差	均数	标准差	相对标准差
15.0	15.5	0.5	3.22	14.5	0.5	3.45
20.0	19.2	0.9	4.61	20.8	0.9	4.32
30.0	29.1	1.2	4.12	31.5	1.4	4.45
40.0	42.2	2.0	4.74	38.6	1.8	4.66

2.6 干扰试验 本研究中的紫外分光光度法测定秋水仙碱中毒血清样品的前处理是参考紫外分光光度法测定秋水仙碱原料药或片剂样品前处理进行的,所以要考虑血清基质的干扰问题。本次试验用空白血清或甲醇做基线测量比较,结果显示用空白血清做基线测量可以排除血清基质的干扰,最大吸收峰为(352±1)nm,但对于胃液或药片鉴定的萃取扫描,还是要以甲醇做基线测量较好。

2.7 应用 患者,男性,60 岁,2013 年 7 月 20 日因双下肢肿痛,行走不利,前往天津某医院就诊,查尿酸 821 μmol/L⁻¹,类风湿因子阳性,被诊断为痛风,以秋水仙碱片(昆明制药集团股份有限公司)治疗,口服后第 5 天患者出现乏力腹泻,大便色黄,为稀烂便,量少,日解 7~8 次等胃肠炎症状。以胃肠炎来本院就诊,经急诊检查血常规有全血细胞计数减低等。后经医师详细询问服用过的药物和剂量后,怀疑有化学药物中毒。随即抽血送毒物分析,采用血清紫外分光光度测定法,结果血液

中秋水仙碱浓度为 8.62 μg/μL,被诊断为秋水仙碱中毒。经输液抗酸保护心、肝、肾脏等对症治疗后痊愈。通过本例和国内外报道病例观察,秋水仙碱服用 30~120 min 后吸收,3~7 d 可对患者的骨髓产生抑制甚至引起凝血障碍,严重者可损害心脏、肝脏、肾脏、呼吸和神经系统等,可有多脏器衰竭、血红蛋白尿和乳酸性酸中毒等致命性后果。患者抢救成功的最重要并与生存相关的因素是药物摄入的剂量和摄入后到达医院就诊的时间,如果用药情况不明确或剂量不详时,血清毒物检测的结果对患者的及时诊治显得至关重要。

3 讨论

秋水仙碱常用的检测方法是分光光度法和高效液相色谱法等^[10],根据秋水仙碱分子结构中的共轭体系在紫外光区 350 nm 处有特征吸收峰,吸光度的大小与溶液的浓度成正比,本文探讨了紫外分光光度法测定血清中秋水仙碱。用甲醇作溶剂配制不同浓度的秋水仙碱应用液,选择 200~500 nm 波长扫描,秋水仙碱的最大吸收峰为(351±1)nm。秋水仙碱是一种生物碱,理化性质是易溶于水、甲醇、乙醇和氯仿,利用秋水仙碱的这一理化性质,选择混合萃取液(氯仿:甲醇=95:5)、氯仿、甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮分别萃取不同浓度的秋水仙碱血清样品,按样品测定部分操作,结果显示混合萃取液(氯仿:甲醇=95:5)效果最佳,秋水仙碱回收率达 92.3%~100%,血清中秋水仙碱最大吸收峰为(351±1)nm。所以本试验选择了混合萃取液提取血清中的秋水仙碱,紫外分光光度法进行扫描,取得了满意的结果,为临床诊断疑似秋水仙碱中毒提供了一个可靠的试验方法。

参考文献

- [1] Eddleston M, Persson H. Acute plant poisoning and antitoxin antibodies[J]. J Toxicol Clin Toxicol, 2003, 41(3): 309-315.
- [2] Mendis S. Colchicine cardiotoxicity following ingestion of Gloriosasuperba tubers[J]. Postgrad Med J, 1989, 65(2): 752-755.
- [3] Lee KY, Kim DY, Chang JY, et al. Two cases of acute leukopenia induced by colchicine with concurrent immunosuppressants use in Behcet's disease[J]. Yonsei Med J, 2008, 49(1): 171-173.
- [4] Efe C, Purnak T, Ozaslan E, et al. Thiocolchicoside-induced liver injury[J]. Clinics (Sao Paulo), 2011, 66(3): 521-522.
- [5] Erden A, Karagoz H, Gumuscu HH, et al. Colchicine intoxication: a report of two suicide cases[J]. Ther Clin Risk Manag, 2013, 9(2): 505-509.
- [6] Maxwell MJ, Muthu P, Pritty PE. Accidental colchicine overdose. A case report and literature review[J]. Emerg Med J, 2002, 19(1): 265-267.
- [7] 范洪涛, 尤楠, 唐世军. 秋水仙碱分析方法的研究概述[J]. 化学研究, 2010, 21(4): 96-101.
- [8] 何红平, 刘复初. 秋水仙碱的研究进展[J]. 中草药, 1998, 29(10): 712-714.
- [9] 牛文凯, 邱泽武. 秋水仙碱中毒的诊断与处理[J]. 药物不良反应杂志, 2006, 8(5): 368-369.
- [10] 钱斌, 杨龙, 李雪松, 等. 秋水仙碱的含量测定方法[J]. 中国药业, 2009, 6(1): 276-277.

(收稿日期: 2014-06-08)