

新型氮氧自由基对心脑缺血/再灌注损伤模型大鼠的保护作用研究[△]

贾玉晶^{1*}, 朱晓鹤², 冯力³, 高鹏¹, 文爱东², 孙晓莉^{1#} (1.第四军医大学药学院化学教研室, 西安 710032; 2.第四军医大学西京医院药剂科, 西安 710032; 3.第四军医大学药学院天然药物学教研室, 西安 710032)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)17-1565-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.17.09

摘要 目的:研究新型氮氧自由基(N1)对心脑缺血/再灌注(I/R)损伤模型大鼠的保护作用。方法:取大鼠分别建立脑I/R模型和心肌I/R(MI/R)模型,将两种模型大鼠分别分为假手术(0.9%氯化钠注射液)组、模型(0.9%氯化钠注射液)组、阳性对照(传统的氧自由基清除剂Tempol, 100 mg/kg)组和高、中、低剂量(N1, 100、50、10 mg/kg)组,每组6只,均在建模前腹腔注射相应药物。就脑I/R模型,通过神经功能评分和脑梗死容积百分率评价N1的脑保护功能;就MI/R模型,通过左室收缩压(LVSP)、左室等容收缩/舒张期压力上升或下降最大速率($\pm dp/dt_{\max}$)和血清中肌酸激酶(CK)活性、丙二醛(MDA)的水平评价N1的心脏保护功能。结果:脑I/R模型中,与模型组比较,阳性对照组和各剂量组大鼠神经功能评分均明显增加,脑梗死容积百分率明显减小($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与阳性对照组比较,中、高剂量组大鼠脑梗死容积百分率明显减小($P<0.05$)。MI/R模型中,与模型组比较,阳性对照组和各剂量组大鼠的LVSP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),各剂量组大鼠血清中CK活性、MDA水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与阳性对照组比较,高、中剂量组大鼠的LVSP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清中CK活性、MDA水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:N1对大鼠的心脑I/R损伤均具有明显的保护作用,且保护作用强于Tempol。

关键词 氮氧自由基;Tempol;心肌;脑;缺血/再灌注损伤;大鼠

Protective Effects of New Type Nitroxide Radicals on Myocardial and Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

JIA Yu-jing¹, ZHU Xiao-he², FENG Li³, GAO Peng¹, WEN Ai-dong², SUN Xiao-li¹ (1.Dept. of Chemistry, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2.Dept. of Pharmacy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3.Dept. of Natural Medicine, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study protective effects of new type nitroxide radicals (N1) on myocardial and cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury model rats. **METHODS:** Cerebral I/R model and myocardial I/R model (MI/R) were established respectively. 2 kinds of model rats were divided into sham operation group (0.9% Sodium chloride injection), model group (0.9% Sodium chloride injection), positive control group (traditional oxyradical scavenger Tempol, 100 mg/kg) and N1 high-dose, medium-dose and low-dose groups (100, 50, 10 mg/kg) with 6 rats in each group. They were given relevant medicine intraperitoneally before modeling. The protective function of N1 in cerebral I/R model was evaluated by neurological function score and the percentage of cerebral infarction volume; in MI/R model, the cardiac protection function of N1 was measured with the changes of the LVSP, maximum rate of left ventricular isovolumetric systolic/diastolic pressure rising or falling ($\pm dp/dt_{\max}$), serum CK activity and MDA level. **RESULTS:** Compared with cerebral I/R model group, neurological function score of positive control group and N1 groups increased significantly, while the percentage of cerebral infarction volume decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with positive control group, the percentage of cerebral infarction volume decreased significantly in N1 high-dose and medium-dose groups ($P<0.05$). Compared with MI/R model group, the levels of LVSP and $\pm dp/dt_{\max}$ in positive control group and N1 groups increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the serum activity of CK and levels of MDA of N1 groups decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with positive control group, the levels of LVSP and $\pm dp/dt_{\max}$ in N1 high-dose and medium-dose groups increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the serum activity of CK and levels of MDA decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS:** N1 has obvious protective effects against myocardial and cerebral I/R, and is better than Tempol.

KEYWORDS Nitroxide radicals; Tempol; Myocardial; Cerebral; Ischemia-reperfusion injury; Rats

据统计,每年因缺血性脑损伤及心脏病死亡的人数超过

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81302627, 21202202);
“十二五”国家科技部科技支撑计划项目(No.2013BAK03B05)

* 硕士研究生。研究方向:新药合成、药理学。电话:029-84774473。E-mail: yujingjia8740@126.com

通信作者:教授,博士研究生导师,博士。研究方向:新药合成。E-mail: xiaolis@fimmu.edu.cn

因恶性肿瘤死亡的人数^[1]。缺血/再灌注(I/R)发生可以诱导大量有害活性氧(ROS)自由基的产生,过多的ROS的积聚,会导致DNA断裂和细胞的坏死。给予外源性抗氧化剂可以达到有效清除ROS的作用。氮氧自由基(Nitroxide radicals, NRs)可以催化的方式清除有害氧自由基,其作用比相同浓度的超氧化物歧化酶(SOD)强约百万倍^[2]。1-氧基-2,2,6,6-四甲基哌啶(1-oxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine, TEMPO)和咪唑类氮

氧自由基 (Imidazole nitroxyl nitroxide radicals, NIT) 是 NRs 的两大主要类别。早期 NRs 主要被用作阐明细胞膜结构和功能的自旋示踪剂^[3], 近年来研究发现 NRs 具有防护电离辐射^[4]、预防 I/R 损伤^[5]和神经退行性疾病^[6]等作用。

在本实验中笔者采用 TEMPO 类的代表药物 1-氧基-4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶 (1-oxy-4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine, Tempol) 和我们合成的新型 NIT 类 *L*-氮硝基苯甲酰吡咯烷基化合物 (*L*-*N*-p-nitrobenzoylpyrrolidinyl, 4,5-dihydro-4,4,5,5-tetramethyl-3-oxido-1*H*-imidazol-3-ium-1-oxy-2-yl, N1), 分别考察二者对心脑 I/R 的保护作用。

1 材料

1.1 仪器

脑血流监测仪 (瑞典 Perimed 公司); 颞温监测仪 (第四军医大学生物医学工程系); RM-6280 多导生理记录和分析处理系统 (成都仪器厂); 鼠脑槽 (美国 AS-II 公司)。

1.2 药品与试剂

Tempol, 2,3,5-氯化三苯四唑 (TTC) (美国 Sigma 公司, 纯度: 均为 98%); N1 (第四军医大学化学教研室合成, 熔点: 200~205 °C, 纯度: >98%); 肌酸激酶 (CK) 和丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成公司, 批号: 20120902, 20121112)。

1.3 动物

SD 大鼠 48 只, ♂, 体质量 280~320 g, 均由第四军医大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK (陕) 2009-0021。

2 方法

2.1 脑 I/R 模型的建立^[7]

大鼠术前 12 h 禁食, 自由饮水, 用戊巴比妥钠麻醉后, 采用线栓法制备脑 I/R 模型 (MCAO): 于大鼠颈正中切口, 暴露右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉, 结扎颈总动脉、颈外动脉, 于颈总动脉分叉下方剪一切口, 将末端用酒精灯烧成圆头的尼龙线置入颈内动脉 17~18 mm, 结扎颈内动脉, 阻断 2 h 后, 抽出尼龙线, 恢复再灌注。假手术过程与上述基本相同, 但线栓并未置入大脑中动脉起始处。术中大鼠由颞温探头连接颞温监测仪监测体温, 用烤灯维持体温在 37.0~37.5 °C。

2.2 心肌 I/R (MI/R) 模型的建立^[8]

将大鼠以戊巴比妥钠麻醉后, 按线栓法制备大鼠 MI/R 模型: 于大鼠颈正中切口、气管插管, 连接呼吸机进行正压人工呼吸, 经右颈总动脉插管至左心室, 记录左室压及其微分; 开胸暴露心脏, 于冠状动脉前降支 (LAO) 根部穿 5-0 丝线稳定 10 min 后, 结扎; 以心电图 ST 段抬高为结扎成功的指标, 缺血 30 min 后, 松开结扎线, 冠脉再灌注 3 h。假手术过程与上述基本相同, 但线栓并未置入 LAO。术中由肛温探头连接多功能监测仪监测体温, 用烤灯维持体温在 37.0~37.5 °C。

2.3 建模与分组

取大鼠分别建立脑 I/R 模型和 MI/R 模型, 将两种模型大鼠分别分为假手术组、模型组、阳性对照组和高、中、低剂量组, 每组 6 只。

2.4 给药方法

阳性对照组大鼠在再灌注前 10 min 腹腔注射 Tempol 100 mg/kg^[9]; 高、中、低剂量组大鼠分别在灌注前 10 min 腹腔注射 N1 100、50、10 mg/kg; 假手术组和模型组大鼠在灌注前 10 min 腹腔注射等容积的 0.9% 氯化钠注射液 (生理盐水)。

2.5 神经功能评分

术毕, 大鼠苏醒后, 放回鼠笼自由饮食。通过心电图确定脑 I/R 模型建立成功后开始计时, 分别于 24、72 h 根据 Garcia 评分法^[10]评估并记录神经功能评分。观察大鼠是否有以下现象:

(1) 自发活动; (2) 四肢运动的对称性; (3) 前肢伸展爬行动作的对称性; (4) 爬壁笼; (5) 推躯干反应; (6) 触须对刺激的反应。如果大鼠无前 3 项活动 (四肢或患肢) 为 0 分, 少许活动为 1 分, 活动较正常为 2 分, 活动正常为 3 分; 后 3 项无反应为 1 分, 活动较正常为 2 分, 活动正常为 3 分。总分最高 18 分, 最低 3 分。

2.6 脑梗死容积百分率的检测

脑 I/R 模型建立成功后 72 h, 断头处死大鼠, 迅速取出鼠脑, 置于冰生理盐水中 10 min, 取冠状面均匀切成 2 mm 厚的脑片, 迅速放入 20 g/L 的 TTC 溶液 (37 °C) 中染色 30 min, 用 40 g/L 的多聚甲醛缓冲液固定, 24 h 后用数码相机拍照, 用图像处理软件计算梗死面积。为校正脑水肿带来梗死容积的偏差, 用占对侧正常容积的百分比表示梗死容积, 计算脑梗死容积百分率 = [(对侧正常组织的容积 - 同侧正常组织的容积) / 对侧正常组织的容积] × 100%。

2.7 心脏功能检测

通过 RM-6280 多导生理记录仪持续监测计算各组 MI/R 大鼠的心电及血流动力学指标: 心率、左室收缩压 (LVSP)、左室等容收缩/舒张期压力上升或下降的最大速率 ($\pm dp/dt_{max}$)。

2.8 血清中肌酸激酶 (CK) 活性和丙二醛 (MDA) 水平的检测

于 MI/R 建立成功后 3 h, 由颈动脉取血 2 ml, 常温静置 30 min, 以 3 000 r/min (离心半径 200 mm) 离心 20 min。取血清按照试剂盒的说明书操作检测 CK 活性, 用硫代巴比妥酸比色法检测血清中 MDA 水平。

2.9 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用 SNK (Student Newman Keuls) 检验。神经功能评分用中位数 (最大值/最小值) 表示, 采用非参数检验, 同一时间点各组间两两比较, 采用 Mann Whitney U 检验。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 神经功能评分

与模型组比较, 阳性对照组和低、中、高剂量组大鼠的神经功能评分均明显增加 (P < 0.05 或 P < 0.01); 与阳性对照组比较, 高中低剂量组大鼠建模成功后 72 h 的神经功能评分均明显增加 (P < 0.05 或 P < 0.01), 结果见表 1。

表 1 各组脑 I/R 模型大鼠的神经功能评分 (n = 6)

Tab 1 Neurological function score of cerebral I/R model rats in each group (n = 6)

组别	成功后 24 h (最低值/最高值)	成功后 72 h (最低值/最高值)
假手术组	18(18/18)	18(18/18)
模型组	7(7/9)	8(8/9)
阳性对照组	10.5(9.5/11.5)*	11(10/12)*
低剂量组	10.5(9.5/11.5)*	13(12/13)***
中剂量组	11.5(9.5/12)*	14(13/14)***
高剂量组	13.5(11.5/14)**	16(15/16)****

与模型组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 与阳性对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

vs. model group: * P < 0.05, ** P < 0.01; vs. positive control group: * P < 0.05, ** P < 0.01

3.2 脑梗死容积

脑 I/R 建模成功后 72 h, 假手术组大鼠未见脑梗死灶, 模型组、阳性对照组和低、中、高剂量组大鼠的脑梗死容积百分率分别为 (42.36 ± 6.39)%、(32.48 ± 8.36)%、(30.07 ± 4.34)%、(22.56 ± 6.52)%、(15.32 ± 3.91)%。与模型组比较, 低、中、高剂量组大鼠的脑梗死容积百分率均明显减小 (P < 0.01), 且中、

高剂量组大鼠脑梗死容积百分率比阳性对照组更小($P<0.05$),表明N1的脑保护作用优于Tempol。脑梗死显微镜图见图1。

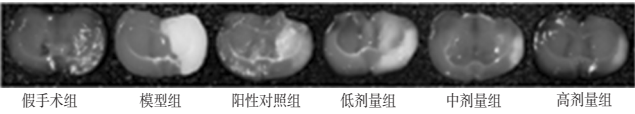


图1 各组脑I/R模型大鼠脑梗死显微镜图
Fig 1 Cerebral infarction micrographs of cerebral I/R model rats in each group

3.3 心脏功能

MI/R建模成功后,各组大鼠的心率比较差异无统计学意义。与模型组比较,阳性对照组和低、中、高剂量组大鼠的LVSP和 $\pm dp/dt_{max}$ 均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与阳性对照组比较,中、高剂量组大鼠的LVSP和 $\pm dp/dt_{max}$ 均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结果见表2(1 mm Hg=0.133 kPa)。

表2 各组MI/R大鼠的LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 结果比较($\bar{x}\pm s, n=6$)
Tab 2 Comparison of LVSP and $\pm dp/dt_{max}$ in MI/R model rats of each group($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	LVSP, mm Hg	$+dp/dt_{max}$, mm Hg	$-dp/dt_{max}$, mm Hg
假手术组	135 $\pm$ 13	3 623 $\pm$ 274	3 419 $\pm$ 239
模型组	61 $\pm$ 23	1 426 $\pm$ 151	1 369 $\pm$ 302
阳性对照组	83 $\pm$ 16*	2 029 $\pm$ 161*	1 655 $\pm$ 175*
低剂量组	88 $\pm$ 14*	1 884 $\pm$ 149*	1 824 $\pm$ 93*
中剂量组	108 $\pm$ 16***	2 533 $\pm$ 88***	2 348 $\pm$ 186***
高剂量组	124 $\pm$ 10***	3 035 $\pm$ 113***	3 043 $\pm$ 101***

与模型组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与阳性对照组比较: * $P<0.05$, *** $P<0.01$
vs. model group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. positive control group: * $P<0.05$, *** $P<0.01$

3.4 血清中CK活性和MDA水平

与模型组比较,阳性对照组和低、中、高剂量组大鼠血清中CK活性、MDA水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中高、中剂量组比阳性对照组降低更明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结果见表3。

表3 各组MI/R大鼠血清中CK和MDA水平比较($n=6$)
Tab 3 Comparison of the serum activity of CK and levels of MDA in MI/R model rats of each group($n=6$)

组别	CK, u/ml	MDA, μ mol/L
假手术组	2.3 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 1.1
模型组	11.6 $\pm$ 1.6	11.6 $\pm$ 2.3
阳性对照组	6.9 $\pm$ 1.2	9.2 $\pm$ 1.3
低剂量组	6.5 $\pm$ 0.4*	8.6 $\pm$ 0.4*
中剂量组	4.8 $\pm$ 0.7**	6.3 $\pm$ 0.6***
高剂量组	3.6 $\pm$ 1.3**	4.2 $\pm$ 1.3***

与模型组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与阳性对照组比较: * $P<0.05$, *** $P<0.01$
vs. model group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. positive control group: * $P<0.05$, *** $P<0.01$

4 讨论

缺血所引起的组织损伤是致死性疾病的主要原因,如心肌梗死、脑卒中等。缺血引起一系列级联反应,通过不同的途径增加了ROS的生成。在缺血过程中,由于氧和葡萄糖基质的缺乏,细胞无法产生三磷酸腺苷(ATP),使得依赖于ATP的离子泵失活,膜去极化,严重影响了膜两侧的离子浓度梯度,导致细胞外的 Ca^{2+} 内流,激活胞内的蛋白酶和酯酶,进而破坏

组织^[1]。随着当今社会的老龄化,人类心脑血管病的发病率日益升高,因此制备一种较理想的心脑I/R动物模型是研究心脑血管病的重要手段及前提条件。采用线栓法制备大鼠脑I/R和MI/R模型目前普遍为人们所接受,是进行心脑血管病理生理研究及其治疗药物研制的常用模型。

针对缺血引起的氧化应激的治疗,有许多的抗氧化的方法和药物。相较其他抗氧化剂而言,NRs清除自由基是通过快速循环的方式,这是其他抗氧化剂不可比拟的。已有研究证实,Tempol在较高剂量(100 mg/kg)才有保护作用^[9],而我们经结构改造后新合成的N1在相同剂量比Tempol表现出更好的抗氧化能力,且在低、中剂量组也表现出显著的心脑I/R损伤的保护作用。这是因为NIT类的自旋单电子分布更广、结构稳定,因此就结构而言,其抗氧化能力比TEMPO类更强。

研究结果显示,在脑保护方面,Tempol和N1均能显著改善大鼠脑I/R损伤的神经功能评分、减少脑梗死容积,且N1的效果更加显著。在心脏保护方面,实验结果显示,N1中、高剂量组大鼠CK、MDA的活性明显降低,且低于阳性对照组,说明N1可以减少缺血心肌细胞死亡,且作用强于Tempol。

尽管目前研究发现Tempol的心脑保护机制多样,但多项实验研究均证实抗氧自由基损伤在其心脑保护效应中发挥了重要的作用^[12]。N1是新合成的NRs,其心脑保护效应与Tempol类似。本研究为其作为一种可能的缺血性疾病治疗候选药提供了有力的证据。尽管关于NIT类NRs治疗缺血性疾病的临床研究还没有开展,但是N1这一类型的自由基清除剂为NRs在未来缺血性疾病的治疗拓展了新的道路。NRs清除自由基的能力只是一方面,因其带有可自旋的单电子,在磁功能成像中也有非常重要的用途^[13]。同时N1分子质量较小,易通过血脑屏障,不仅可以作为一种新型的自由基清除剂,也很可能开发成一种用于缺血性疾病诊断的分子探针。

综上所述,N1对大鼠的心脑I/R损伤均具有明显的保护作用,且保护作用强于Tempol,但其具体机制尚未完全明确,有待进一步研究。

参考文献

[1] 夏强,钱令波. 心脑血管再灌注损伤的机制及防治策略研究进展[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2010, 39(6): 551.
[2] Culcasi M, Rockenbauer A, Mercier A, et al. The line asymmetry of electron spin resonance spectra as a tool to determine the cis:trans ratio for spin-trapping adducts of chiral pyrrolines N-oxides: the mechanism of formation of hydroxyl radical adducts of EMPO, DEPMPO, and DIPP-MPO in the ischemic-reperfused rat liver[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40(9): 1 524.
[3] Samuni AM, Barenholz Y. Stable nitroxide radicals protect lipid acyl chains from radiation damage[J]. Free Radic Biol Med, 1997, 22(7): 1 165.
[4] Ramachandran L, Nair CK. Prevention of γ -radiation induced cellular genotoxicity by tempol: protection of hematopoietic system[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2012, 34(2): 253.
[5] Teke Z, Kabay B, Bir F. Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on local and remote organ injuries caused by intestinal ischemia/reperfusion in rats [J]. J Surg Res, 2008, 149(2): 259.
[6] Shi TY, Zhao DQ, Wang HB, et al. A new chiral pyrrolyl α -nitronyl nitroxide radical attenuates β -amyloid deposi-

GC-MS法测定一次性使用静脉营养输液器中增塑剂DEHP的溶出量

沈卫阳*, 宋旻昕, 金祥飞, 史文吏(中国药科大学理学院/药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京210009)

中图分类号 R972;R979.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)17-1568-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.17.10

摘要 目的:建立测定一次性使用静脉营养输液器中增塑剂邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)溶出量的方法。方法:采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)法,以邻苯二甲酸二丁酯为内标,使用一次性使用静脉营养输液器制备营养液,测定室温放置和模拟临床输液24 h后营养液中DEHP的溶出量。采用Rtx-5 MS色谱柱;进样口温度:300℃;载气:氦气;程序升温模式:起始温度200℃,15℃/min升温至280℃,维持5 min;EI离子源,离子源温度:250℃,接口温度:280℃;采集模式:选择离子监测模式(SIM);质荷比(m/z) 149。结果:DEHP检测质量浓度的线性范围为0.2~30 μg/ml($r=0.999\ 8$),检测限为0.01 μg/ml,定量限为0.04 μg/ml,平均回收率为102.4%,RSD为4.23%($n=3$),精密密度试验RSD为2.7%($n=5$)。室温放置24 h营养液中DEHP溶出量为0.547~17.400 mg,模拟临床输液24 h后营养液中DEHP溶出量为8.779~10.620 mg,均小于成人的耐受摄入量(30 mg)。结论:本法简单、快速、准确,可用于一次性使用静脉营养输液器中DEHP溶出量的测定。

关键词 一次性使用静脉营养输液器;邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯;气相色谱-质谱联用

Determination of DEHP Released from Disposable Venous Nutrition Transfusion Instruments by GC-MS

SHENG Wei-yang, SONG Min-xin, JIN Xiang-fei, SHI Wen-li (School of Science, China Pharmaceutical University/Key Lab of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of the dissolution of di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP) from disposable venous nutrition transfusion instruments. METHODS: GC-MS analysis was performed. Using dibutyl phthalate as internal standard, the determination was performed on Rtx-5 MS column with injector temperature of 300℃ using helium as carrier gas by temperature programming: initial temperature 200℃, increasing to 280℃ at rate of 15℃/min maintained for 5 min. EI ion source was adopted with temperature of 250℃ in acquisition mode; the injector temperature was set at 280℃. The ion monitoring mode was SIM, and the selected ion was m/z 149. RESULTS: The linear range of DEHP was 0.2-30 μg/ml ($r=0.999\ 8$) with an average recovery of 102.4% (RSD=4.23%, $n=3$). The detection limit was 0.01 μg/ml, and the limit of quantification was 0.04 μg/ml. RSD of precision test was 2.7% ($n=5$). The dissolution of DEHP were 0.547-17.400 mg at room temperature for 24 hours. The dissolution of DEHP were 8.779-10.620 mg after 24 h simulated use in the clinic, which were not more than the limit of tolerance intake (30 mg). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, and can be used for the determination of DEHP released from disposable venous nutrition transfusion instruments.

KEYWORDS Disposable venous nutrition transfusion instruments; Di (2-ethyl hexyl) phthalate; GC-MS

- tion and rescues memory deficits in a mouse model of alzheimer disease[J]. *Neurotherapeutics*, 2013, 10(2):340.
- [7] 先雄斌,杨朝鲜.大鼠脑缺血再灌注模型的建立[J].中国老年学杂志,2009,29(19):2521.
- [8] 汪梦霞,廖锦华,马达,等.大鼠在体心肌缺血再灌注模型的建立[J].临床医学工程,2013,20(5):533.
- [9] McDonald MC, Zacharowski K, Bowes J, et al. Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27(5/6):493.
- [10] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4):627.
- [11] Villena J, Henriquez M, Torres V, et al. Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(6):1146.
- [12] Abdallah DM, El-Abhar HS, Abdel-Aziz DH. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates gastric mucosal damage induced by ischemia/reperfusion: a key role for superoxide anion[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 603(1/3):93.
- [13] Matsumoto K, Hyodo F, Koretsky AP, et al. High-resolution mapping of tumor redox status by magnetic resonance imaging using nitroxides as redox-sensitive contrast agents[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(8):2455.
- *(收稿日期:2013-10-18 修回日期:2014-02-17)
- * 副教授,博士。研究方向:仪器分析与药物质量控制。电话:025-86185380。E-mail:wyshen@hotmail.com