

高压液相色谱-串联质谱法检测食物中毒样品中的乌头碱

刘华良*, 阮丽萍, 刘德晔, 周明浩
(江苏省疾病预防控制中心, 南京 210009)

摘要: **目的** 建立引起食物中毒的芝麻糊中乌头碱的高压液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定方法。**方法** 样品经0.1%甲酸-2 mmol/L 甲酸铵缓冲溶液振荡提取后, 离心、过滤, 以等体积比的甲醇和甲酸-甲酸铵缓冲溶液为流动相, 经 C₁₈ 色谱柱分离后以多反应监测质谱测定。**结果** 方法的线性范围为 1~1000 μg/L, 线性相关系数为 0.999, 最低定量浓度(LOQ)为 10 μg/kg, 在 50~5000 μg/kg 添加水平下平均回收率为 82%~94%, 相对标准偏差(RSD)为 4.9%~7.4%。**结论** 该方法能够满足食物中毒样品中乌头碱的检测。**关键词:** 高压液相色谱-串联质谱法; 乌头碱; 食物中毒样品; 芝麻糊

Determination of aconitine in food poisoning samples by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Hua-Liang*, RUAN Li-Ping, LIU De-Ye, ZHOU Ming-Hao

(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for determination of aconitine in poisoning sesame paste samples by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted by formic acid (0.1%)-ammonium formate (2 mmol/L) buffer. The extract was centrifuged and filtered by 0.45 μm nylon membrane filters before being analyzed with HPLC-MS/MS. A Waters Acquity BEH C₁₈ column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) was adopted with the mobile phase of methanol and formic acid (0.1%)-ammonium formate (2 mmol/L) buffer (1:1, v/v). Aconitine was detected by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) under multiple reactions monitoring (MRM) mode. **Results** The method showed a good linearity in the range of 1~1000 μg/L with correlation coefficients of 0.999, and the LOQ was 10 μg/kg. The average recoveries were 82%~94% at the spiked level of 50~5000 μg/kg with the relative standard deviation (RSD) of 4.9%~7.4%. **Conclusion** This method can meet requirements of fast and accurate determination of aconitine in food poisoning samples.

KEY WORDS: high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); aconitine; food poisoning samples; sesame paste

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(BE2010745)、江苏省“十二五”科教兴卫工程项目(ZX201109)

Fund: Supported by Jiangsu Provincial Science and Technology Support Project (BE2010745) and Jiangsu Provincial 12th Five-Year Health Development Project with Science and Education (ZX201109)

*通讯作者: 刘华良, 副研究员, 主要研究方向为食品安全保障技术。E-mail: LHL-1@163.com

*Corresponding author: LIU Hua-Liang, Associate Researcher, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, No. 172, Jiangsu Road, Nanjing 210009, China. E-mail: LHL-1@163.com

乌头碱(aconitine)又名附子精,为六方形片状结晶,其CAS号为302-27-2,分子式为 $C_{34}H_{47}NO_{11}$,分子结构见图1。乌头碱存在于川乌、草乌、附子、雪上一枝蒿等中药材中。这类中药及其复方制剂具有祛风湿、温经止痛的功效。由于此类中药材的主要成分乌头碱为剧毒的双酯型生物碱,成人口服纯乌头碱0.2 mg即可中毒,3~5 mg可致死^[1],故临床上都是在一定的限量范围内使用。

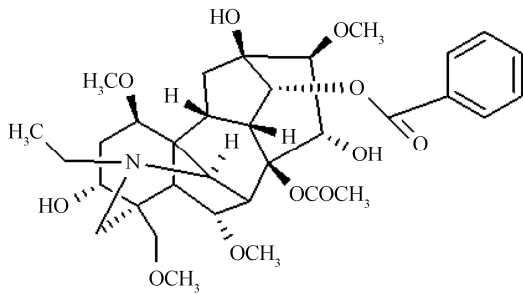


图1 乌头碱的分子结构图

Fig. 1 Molecular structure of aconitine

2010年12月11日,重庆渝北区大湾镇发生一起村民误服乌头碱泡制的外用药酒引起的意外中毒事件,死亡3人^[2]。2013年2月28日上午,南京市发生一例食用问题芝麻糊致1人死亡事件,我实验室排除了若干毒物后,最后检出乌头碱^[3]。事后调查发现,问题芝麻糊除了包含黑芝麻、黑豆、核桃仁、大枣、冰糖等成分外,还混入了乌头类中药材。由于我国民间药食同源的养生理念,近年的几起乌头中毒事件都与误服混有乌头碱的食品相关。鉴于已经发生的数起突发食品中毒事件,很有必要建立食品中乌头碱的检测方法,从而为快速确定毒物种类、有效制定病人抢救方案及协助公安机关侦查提供支持。

文献报道乌头碱的测定方法有薄层色谱法(TLC)^[4,5]、高压液相色谱法(HPLC)^[6-8]、高压液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[9-14]。HPLC-MS/MS具有较高的定性能力与灵敏的检测水平,最适宜用于食物中毒事件中中毒源的定性确证检测。已有文献的检测对象包括中药^[8,10,12,13]、生物样本^[5,7,9]、酒^[6],尚无针对固体食品中乌头碱检测的报道。本文建立芝麻糊样品中乌头碱 HPLC-MS/MS 测定方法,为快速确定食品中毒中相关毒物的种类提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂与仪器

甲醇、甲酸与甲酸铵(色谱纯,美国TEDIA公司);乌头碱(中国药品生物制品检定所)。

甲酸-甲酸铵溶液:取1 mol/L甲酸铵溶液1.0 mL、甲酸0.5 mL与500 mL水混合配制,此溶液作为HPLC-MS/MS流动相中的水相,也用作样品提取溶液。

乌头碱标准储备液(1000 mg/L):精确称取10.0 mg(精确到0.1 mg)乌头碱标准品到10 mL容量瓶中,用甲醇作溶剂溶解,定容,混匀,于4℃避光保存。

0.45 μm 针式滤器(尼龙材质滤膜,天津津腾实验设备公司);塑料离心管(1.5 mL,德国Eppendorf公司);正常黑芝麻糊样品(广西南方黑芝麻食品股份有限公司生产,超市购买);引起食物中毒的黑芝麻糊样品(南京市公安局与南京市卫生局提供)。

超高压液相色谱/串联质谱(Acquity/Quattro micro, Waters公司);台式离心机(型号1-14,美国Sigma公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

称取1 g(精确至0.001 g)试样于10 mL离心管中,加入甲酸-甲酸铵溶液至刻度,振荡提取10 min,静置30 min,用移液器移取上层液体1 mL至Eppendorf塑料离心管,12000 r/min离心15 min,清液经针式滤器过滤后上机测定。

1.2.2 仪器条件

色谱柱:Waters Acquity BEH C₁₈柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm);柱温:40℃;流动相:A液为甲醇,B液为甲酸-甲酸铵溶液,A液与B液等比例等度洗脱;流量:0.25 mL/min;进样量:5 μL。离子化方式:ESI⁺;毛细管电压:3.00 kV;源温度:105℃;脱溶剂气温度:350℃;脱溶剂气流量:500 L/h;锥孔气流量:40 L/h;碰撞室压力:3.5×10⁻³ mbar。质谱采集方法见表1。

表1 化合物的质谱条件

Table 1 Mass spectrometric acquisition parameters

母离子 (<i>m/z</i>)	定量离子 (碰撞能量, eV)	定性离子 (碰撞能量, eV)	锥孔电压 (V)
		553.7(30)	
645.6	585.7(20)	525.7(30)	40
		367.8(40)	

1.2.3 测定

从超市购买芝麻糊粉状样品作为空白样品, 同样进行样品前处理。用所得的样品溶液将乌头碱标准储备液逐级稀释得到浓度为 1、5、10、50、100、500、1000 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作液, 浓度由低到高进样检测, 以量子离子峰面积-浓度作图, 得到标准曲线回归方程, 外标法定量。待测样液中乌头碱的响应值应在标准曲线线性范围内, 超过线性范围则应稀释后再进样分析。

2 结果与分析

2.1 液相色谱-质谱条件的优化

已有文献均报道乌头碱采用 ESI^+ 方式电离^[9-14]。在串联四极质谱仪的 MS1 中对化合物标准进行扫描, 确定锥孔电压等分子离子峰丰度最大的条件, 得到乌头碱的母离子 m/z 645.6; 在 MS² 中进行子离子扫描, 改变诱导碰撞能量等参数使其在保证分辨率的条件下灵敏度最佳。选用丰度最大的 1 个子离子 m/z 585.7 作为定量定性离子, 其他 3 个子离子 m/z 553.7、 m/z 525.7、 m/z 367.8 作为辅助定性离子(图 2)。以上 4 个子离子中, 除了 m/z 367.8 外, 其他均有文献报道^[9,11-13]。本方法应用于协助公安系统破案, 为了增加定性的可靠性, 采集了 4 个辅助定性离子(国际通行选择 2 个子离子就可定性)。

2.2 提取方法的选择

中药材中的乌头碱一般采用碱性乙醚提取^[4]。与

中药材不同, 芝麻糊样品中含芝麻、核桃仁、花生仁等成分, 油脂含量高, 若采用乙醚提取, 则油脂成分同时进入提取溶液, 给后续样品处理带来麻烦。考虑到乌头碱属于生物碱, 容易溶解于酸性水溶液, 本文采用酸性缓冲溶液甲酸-甲酸铵水溶液进行提取, 还尝试了在甲酸-甲酸铵提取溶液混入不同比例甲醇的情况, 发现提取溶液中加入甲醇后, 尽管样品提取后离心相对容易, 但共提取的杂质增多, 对后续质谱检测造成离子抑制。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性范围和定量限

乌头碱标准系列溶液的浓度与色谱峰面积线性相关, 线性回归方程为 $Y=85.6X-4.638$, $r=0.999$, 线性范围为 1~1000 $\mu\text{g/L}$ 。当乌头碱标准浓度为 5000 $\mu\text{g/L}$ 时, 检测器响应系数下降。

按信噪比 $S/N=10$ 计算仪器定量下限为 1 $\mu\text{g/L}$, 因为样品处理时稀释了 10 倍, 对应本方法实际样品检测定量限(LOQ)为 10 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.3.2 准确度与精密度

向市售空白芝麻糊粉状样品中分别加入低、中、高三浓度的标准溶液, 使加标量分别为 50、500、5000 $\mu\text{g/kg}$, 混匀后过夜, 依照前述样品处理方法进行测定, 每个添加水平平行测定 6 份。低、中、高三浓度加标样的平均回收率分别为 82%、92%和 94%, 相对标准偏差(RSD)分别为 7.4%、6.2%和 4.9%。加标 5000 $\mu\text{g/kg}$ 水平的芝麻糊粉状样品 MRM 色谱图见图 3。

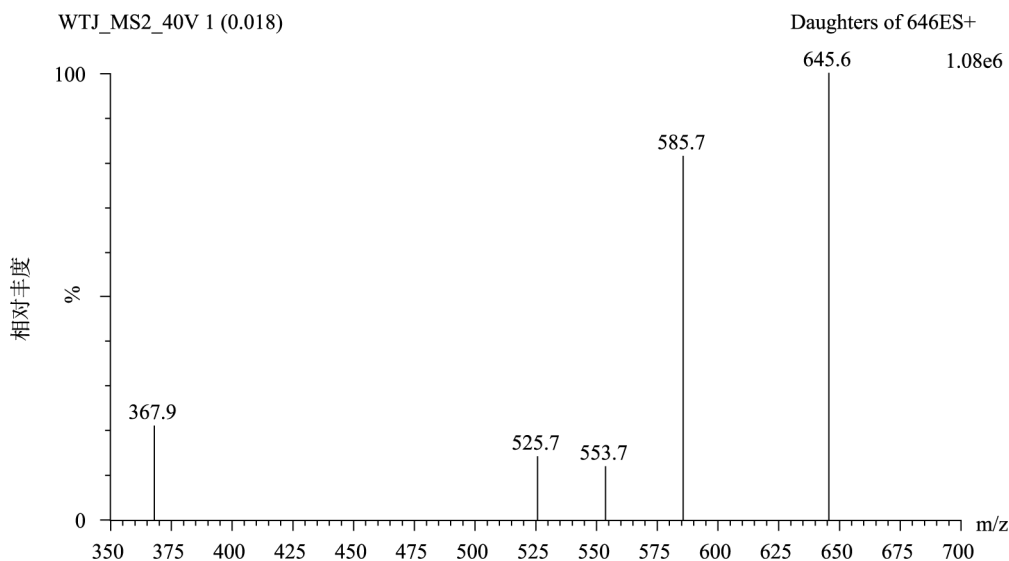


图 2 乌头碱的特征子离子扫描质谱图

Fig. 2 Characteristic ions scan mass spectrum of aconitine

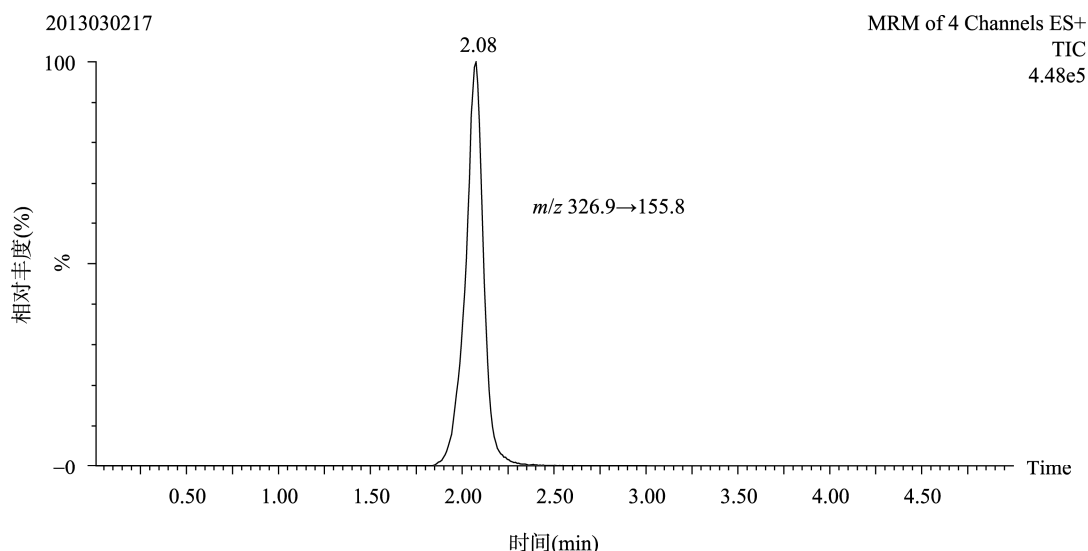


图3 芝麻糊加标 MRM 色谱图(加标浓度 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Fig. 3 MRM chromatogram of aconitine in spiked sesame paste at the spiked level of 5 mg/kg

2.4 实际应用

2013年2月28日,南京市某菜场经营黑芝麻糊生意的杨老板,与同在菜场做生意的陈女士、李女士食用了一位前来退货老太太的黑芝麻后,3人皆发生中毒症状。经过医院救治,陈女士和李女士恢复意识,但杨老板不幸身亡。3月1日,南京市秦淮区政府连夜排查11个小区2万余户居民,告知居民不要食用黑芝麻粉并组织居民退还黑芝麻粉。3月4日,南京市委宣传部发布官方微博通报^[3],经疾控部门检测,问题芝麻粉致人死亡的成分系乌头碱,有关部门已排除人为投毒。此次芝麻粉中含有乌头碱,其直接原因是加工器具受到污染,有关部门正在深入排查。

3 结论

现行药典规定的TLC法^[4,5]与文献报道的HPLC法^[6-8]尚不能满足复杂食品基质中乌头碱的定性确证。相比较而言,本研究建立了芝麻糊中乌头碱的HPLC-MS/MS测定方法,样品经过酸性缓冲溶液提取、离心、HPLC-MS/MS外标法测定,提取方法操作简易、定性能力强、定量灵敏度高,适用于固体粉状食品中痕量乌头碱的定性确证与精确测定。

参考文献

- [1] 温玉麟. 药物与化学物质毒性数据[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1989.
- [2] 渝北“杀人毒酒”事件系乌头碱致命[DB/OL]. http://www.cq.xinhuanet.com/news/2010-12/14/content_21624833.htm. 2010-12-14.
- [3] 南京秦淮问题芝麻粉元凶系乌头碱 [DB/OL]. http://news.longhoo.net/2013-03/04/content_10562798.htm. 2013-03-04.
- [4] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [5] 尉志文, 刘洁, 贡克明, 等. 薄层色谱扫描法快速检测乌头碱中毒[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(9): 1746-1747.
- [6] 李红海, 余陆生, 金鸣. 高效液相色谱法分离测定药酒中乌头碱的含量[J]. 法医学杂志, 2005, 21(1): 35-37.

Wen YL. Drugs and chemical toxicity data [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Publishing House, 1989.

[2] 渝北“杀人毒酒”事件系乌头碱致命[DB/OL]. http://www.cq.xinhuanet.com/news/2010-12/14/content_21624833.htm. 2010-12-14.

Murderer of North Chongqing poisonous wine is aconitine [DB/OL]. http://www.cq.xinhuanet.com/news/2010-12/14/content_21624833.htm. 2010-12-14.

[3] 南京秦淮问题芝麻粉元凶系乌头碱 [DB/OL]. http://news.longhoo.net/2013-03/04/content_10562798.htm. 2013-03-04.

Nanjing Qinhuai poisonous sesame powder incident arised from aconitine[DB/OL]. http://news.longhoo.net/2013-03/04/content_10562798.htm.2013-03-04.

[4] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.

Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2010.

[5] 尉志文, 刘洁, 贡克明, 等. 薄层色谱扫描法快速检测乌头碱中毒[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(9): 1746-1747.

Wei ZW, Liu J, Yun KM, *et al.* Rapid diagnosis of aconites poisoning by TLCs [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(9): 1746-1747.

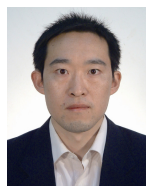
[6] 李红海, 余陆生, 金鸣. 高效液相色谱法分离测定药酒中乌头碱的含量[J]. 法医学杂志, 2005, 21(1): 35-37.

Li HH, Yu LS, Jin M. Separation and determination of aconitine in medicine wine by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. J Forensic Med, 2005, 21(1): 35-37.

- [7] 粟贵, 廖林川, 颜有仪, 等. HPLC 同时测定生物样品中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的含量[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(12): 946-950.
- Su G, Liao LC, Yan YY, *et al.* Simultaneous determination of mesaconitine, aconitine and hypaconitine in blood and liver specimen by HPLC [J]. *Chin Pharm J*, 2009, 44(12): 946-950.
- [8] 周娟, 叶玲, 唐澜, 等. HPLC 同时测定附子乌头碱、中乌头碱、次乌头碱的含量[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(12): 3204-3208.
- Zhou J, Ye L, Tang L, *et al.* Simultaneous content determination of aconitine, mesaconitine and hypaconitine in fuji by HPLC [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2012, 27(12): 3204-3208.
- [9] 陈学国, 赖永权, 蔡宗苇. 液相色谱-电喷雾离子阱质谱分析乌头碱及其代谢物[J]. 质谱学报, 2012, 33(2): 65-73.
- Chen XG, Lai YQ, Cai ZW. Simultaneous analysis of aconitine and its metabolites by liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2012, 33(2): 65-73.
- [10] 崔萍, 杨莉, 熊爱珍, 等. UPLC-MS 法测定消肿片中 3 个乌头碱类双酯型生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 868-872.
- Cui P, Yang L, Xiong AZ, *et al.* Quantification of three aconitine-type diester alkaloids in xiaozhong tablets by UPLC-MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(5): 868-872.
- [11] 李铮, 谭鹏, 王春国. 乌头碱、中乌头碱、次乌头碱及水解产物的电喷雾质谱裂解机制研究[J]. 现代仪器, 2011, 17(2): 41-42.
- Li Z, Tan P, Wang CG. The ESI-MS study on the fragmentation pathways of the aconitine, mesaconitine, hypaconitine and their hydrolyzates [J]. *Mod Instrum*, 2011, 17(2): 41-42.
- [12] 程显隆, 白宗利, 肖新月, 等. 乌头类制品中 3 个双酯型生物碱 RRLC-MS/MS 法分析[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1646-1649.
- Cheng XL, Bai ZL, Xiao XY, *et al.* RRLC-MS/MS simultaneous determination of 3 diester diterpenoid alkaloids in processed products of *Aconitum* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30(9): 1646-1649.
- [13] 王朝红, 文静, 陈义华, 等. 液相色谱质谱联用测定乌头碱在大鼠体内的代谢产物[J]. 中国法医学杂志, 2006, 21(2): 88-90.
- Wang CH, Wen J, Chen YH, *et al.* Determination of metabolites of aconitine in rat urine by HPLC/MS [J]. *Chin J Forensic Med*, 2006, 21(2): 88-90.
- [14] Gaillard Y, Pepin G. Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by high-performance liquid chromatography-(tandem)mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 1999, 733(1): 181-229.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



刘华良, 副研究员, 主要研究方向为食品安全保障技术。
E-mail: LHL-1@163.com