

超高效液相色谱串联质谱法测定自制泡酒中的 3种乌头碱

赵 丽, 李文廷, 张瑞雨, 梁志坚, 师 真*

(昆明市疾病预防控制中心, 昆明 650228)

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定自制泡酒中的乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的分析方法。**方法** 自制泡酒样品经 0.22 μm 滤膜过滤, 稀释或直接进样检测分析, 色谱柱为 C_{18} (50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 20 mmol/L 乙酸铵(0.1%甲酸)-乙腈, 10 min 等阶采样, 质谱进行检测。**结果** 3种乌头碱的线性范围均为 0.2 ~ 600 $\mu\text{g/L}$, 相关系数大于 0.998, 3种乌头碱的检出限分别为 0.10、0.20、0.20 $\mu\text{g/L}$, 3种乌头碱的加标回收率为 66.0% ~ 95.0%, 相对标准偏差为 1.0% ~ 5.0%。**结论** 方法准确、灵敏、选择性强, 适用于泡酒中乌头碱的检测及由乌头碱引起的食物中毒事件的诊断分析。

关键词: 乌头碱; 自制泡酒; 高效液相色谱-质谱法

Determination of three kinds of aconitum alkaloids in self-made sparkling wine by high performance liquid chromatography-mass spectrometry

ZHAO Li, LI Wen-Ting, ZHANG Rui-Yu, LIANG Zhi-Jian, SHI Zhen *

(Kunming Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650228, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of aconitine, hyaconitine and neoaconitine in self-made sparkling wine by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The self-made sparkling wine samples were filtered by a 0.22 μm filter membrane, diluted or directly injected for detection and analysis. The chromatographic column was C_{18} (50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase was 20 mmol/L ammonium acetate-0.1% formic acid aqueous solution, and the samples were sampled for 10 min and analyzed by mass spectrometry. **Results** The linear range of the three kinds of aconitine was 0.2-600 $\mu\text{g/L}$, and the correlation coefficient was greater than 0.998. The detection limits of the three kinds of aconitine were 0.10, 0.20 and 0.20 $\mu\text{g/L}$, respectively. The recovery of the three kinds of aconitine were in the range of 66.0%-95.0%, and the relative standard deviations were in the range of 1.0%-5.0%. **Conclusion** The method is accurate, sensitive and selective. It is suitable for the determination of aconitum alkaloids and the diagnosis and analysis of food poisoning caused by aconitum alkaloids.

KEY WORDS: aconitum alkaloids; self-made sparkling wine; high performance liquid chromatography-mass spectrometry

*通讯作者: 师真, 中级技师, 主要研究方向为水和食品中有机污染物检测。E-mail: 403908568@qq.com

*Corresponding author: SHI Zhen, Technician, Kunming Municipal Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650228, China. E-mail: 403908568@qq.com

1 引言

乌头碱属毛茛科(*Ranunculaceae*)乌头属(*Aconitum*)植物,在我国约 200 种,广泛分布于西南横断山区,它是一类重要的药用植物,据记载有 76 种可供药用^[1],常以地下块根入药,多具有祛风除湿、通经活络的功效^[2,3]。所以,在云南常有食用草乌或制作泡酒食用的习惯。

由于乌头类生物碱化学成分复杂,目前多集中研究乌头碱、次乌头碱、新乌头碱这 3 种。近年来,随着色谱串联质谱技术的快速发展,其高效、高选择性、高分辨率的特点,在植物药用研究中得到广泛应用^[3-5]。目前生物碱的常用检测方法有紫外-可见分光光度法^[6]、高效液相色谱法(High-performance liquid chromatography, HPLC)^[7]、超高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)^[8-14]和超高效液相色谱-飞行时间质谱^[15]法等。本研究在参考以上文献方法的基础上进一步开发了超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-mass spectrometer, UPLC-MS/MS)技术对泡酒中的 3 种乌头生物碱进行定性定量检测,有助于进一步对由生物碱引起的食物中毒患者进行进一步确诊。云南作为食用草乌较多的地区,该方法的建立对本实验室处理突发性食物中毒有极大的帮助,并大大提高了乌头碱检测的能力。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

AB SCIEX API4000 超高效液相色谱串联质谱(配电喷雾离子源)、色谱柱: Thermo synchronis C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)(美国 AB 公司)。

标准品乌头碱(98.86%)、新乌头碱(99.55%)、次乌头碱(98.69%)(北京普天同创生物科技有限公司),用甲

醇溶解配制成标准贮备溶液(600 μg/mL), -20 °C 保存。

甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);甲酸、乙酸铵(色谱纯,美国 Tedia 公司)。

2.2 液相色谱条件

流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.1%甲酸-20 mmol/L 乙酸铵水溶液, A:B=40:60(V:V),流速为 0.3 mL/min,柱温箱温度为 40 °C, 10 min 等阶采样。

2.3 质谱条件

扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 电喷雾电压: 5500 V; 喷雾器压力: 55 psi; 气帘气压力: 25 psi; 离子源温度: 600 °C。

2.4 样品前处理方法

准确量取 1.0 mL 自制泡酒样品于 10.0 mL 容量瓶中,用 40%乙醇水溶液定容,定容后的样品经 0.22 μm 滤膜过滤后待超高效液相色谱-质谱仪检测。

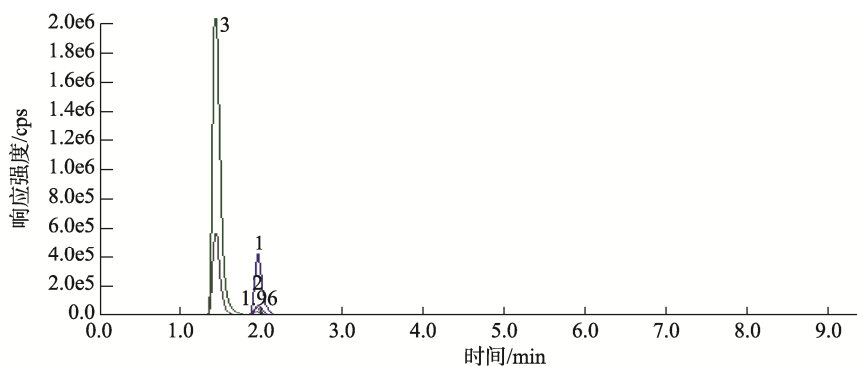
2.5 样品测定

分别取 3 种乌头碱标准溶液配制为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、400.0、600.0 μg/L 标准浓度系列,吸取 10.0 μL 标准溶液或样品溶液进入超高效液相色谱,以色谱峰保留时间进行定性,峰面积进行定量。

3 结果与分析

3.1 质谱条件的优化

为了使 3 种乌头碱完全分离,峰形较好,基质成分无干扰,改变乙腈相和水相的比例,在 C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱上进行优化,具体质谱条件见表 1, 3 种乌头碱标准色谱图分别见图 1。



注: 1、乌头碱; 2、次乌头碱; 3、新乌头碱。

图 1 3 种乌头碱标准 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatogram of three kinds of aconitum alkaloids standard solution

表 1 目标物质质谱参数
Table 1 Target material parameters of mass spectrometry

化合物	前级离子(m/z)	产物离子质量(m/z)	碰撞电压/V	去簇电压/V
新乌头碱	632.4	572 *	48	130.0
		512.1	57	130.0
乌头碱	646.8	368 *	60	130.0
		105.1	63	130.0
次乌头碱	616.8	556.0 *	45	120.0
		338.2	55	120.0

注: 加“*”为定量离子对。

3.2 流动相的选择

为了使目标化合物得到较好的分离, 通过改变流动相的比例来考察流动相对目标化合物出峰的情况的影响, 其流动相组成情况见表 2, 3 种流动相条件下所得标准色谱图见图 2~4。经比较, 采用方法 3 的流动相比比例, 目标物质的灵敏度更高, 分离效果更理想。

表 2 流动相组成表
Table 2 Composition of mobile phase gradient elution

流动相比比例	方法		
	1	2	3
流动相 A(乙腈)	70	55	40
流动相 B(0.1%甲酸, 20 mmol/L 乙酸胺)	30	45	60

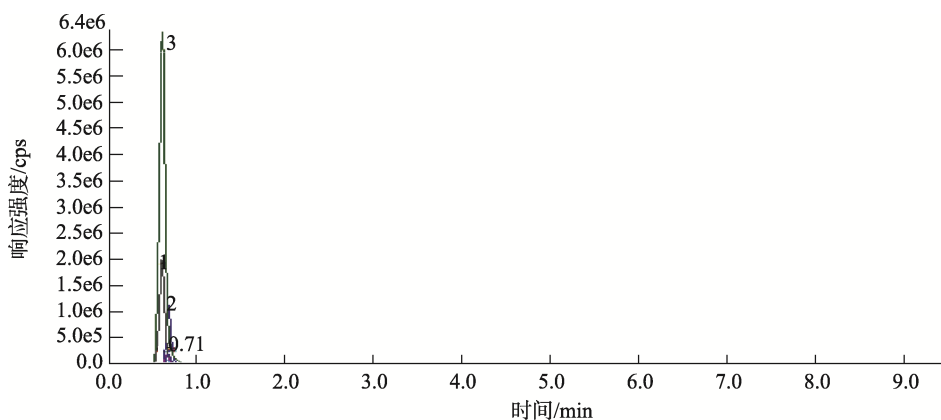
3.3 样品的测定和加标回收实验

(1) 经 2.4 处理过的样品, 经测定得到样品中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的浓度分别为 15.00、260.62、47.80 $\mu\text{g/L}$, 经换算得到自制泡酒中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱浓度分别为 150.0、2600.6、478.0 $\mu\text{g/L}$ 。

(2) 在已测定的样品浓度基础上, 对稀释 10 倍后的样品进行加标试验, 加标浓度为 3 种乌头碱检出浓度的 0.5~2.0 倍。经测定, 加标回收率、精密度良好, 加标回收和精密度结果见表 3。

3.4 线性范围和检出限

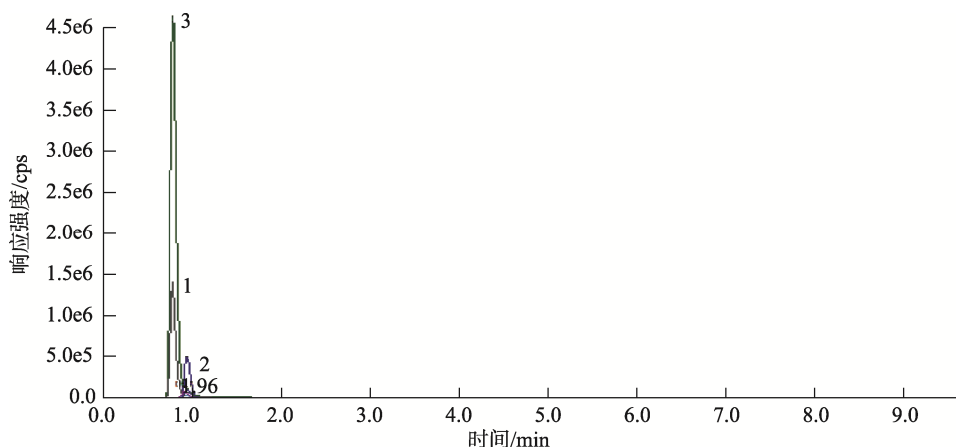
在本实验条件下, 3 种乌头碱在 0.2~600 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好, 相关系数均大于 0.998, 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的方法检出限依次为 0.1、0.2、0.2 $\mu\text{g/L}$, 能够满足自制泡酒中毒样本中 3 种乌头碱分析的要求, 结果见表 4。



注: 1、乌头碱; 2、次乌头碱; 3、新乌头碱。

图 2 方法 1 所得色谱图

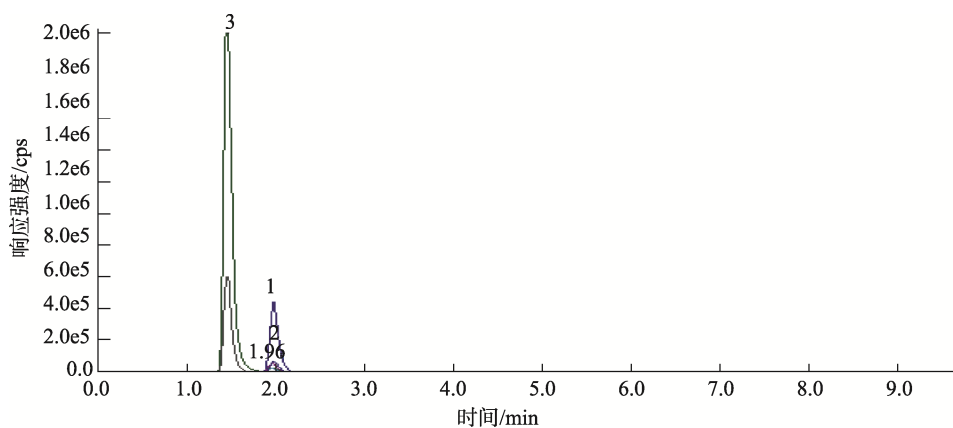
Fig.2 Spectrum of method 1



注: 1、乌头碱; 2、次乌头碱; 3、新乌头碱。

图 3 方法 2 所得色谱图

Fig.3 Spectrum of method 2



注: 1、乌头碱; 2、次乌头碱; 3、新乌头碱。

图 4 方法 3 所得色谱图

Fig.4 Spectrum of method 3

表 3 样品加标回收率(n=6)
Table 3 Recovery rate of sample spiked (n=6)

化合物 加标浓度/($\mu\text{g/L}$)	乌头碱			次乌头碱			新乌头碱		
	检测浓度 /($\mu\text{g/L}$)	回收率 /%	RSD /%	检测浓度 /($\mu\text{g/L}$)	回收率 /%	RSD /%	检测浓度 /($\mu\text{g/L}$)	回收率 /%	RSD /%
10	21.56	66.0	5.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
20	29.72	74.0	4.0	-----	-----	-----	65.29	87.0	1.0
40	44.14	73.0	3.0	-----	-----	-----	84.51	92.0	2.0
100	-----	-----	-----	-----	-----	-----	142.97	95.0	2.0
150	-----	-----	-----	375.85	77.0	1.0	-----	-----	-----
300	-----	-----	-----	489.38	76.0	1.0	-----	-----	-----
450	-----	-----	-----	594.62	74.0	1.0	-----	-----	-----

注: 表格里横线表示未做对应浓度的加标回收率。

表 4 方法线性和检出限
Table 4 Linear equation and detection limits

化合物	保留时间/min	线性方程	相关系数 r	检出限/($\mu\text{g/L}$)	定量限/($\mu\text{g/L}$)
乌头碱	1.90	$Y=684.043X+406.40$	0.9987	0.1	0.3
次乌头碱	1.91	$Y=412.403X+137.51$	0.9993	0.2	0.6
新乌头碱	1.41	$Y=33804X+44298$	0.9991	0.2	0.6

4 结 论

通过流动相的优化和质谱(GC-MS)条件的调试,建立了同时检测自制泡酒中 3 种乌头碱的 UHPLC-MS/MS 检测方法,并获得了良好的线性和加标回收率,因此该方法能有效用于泡酒中毒事件中乌头碱的检测,一方面,大大提高本单位在乌头碱中毒检测方面的能力,从而提高本单位处理突发性食物中毒的能力。另一方面,能对本辖区疾控中心处理乌头碱中毒事件起到指导和借鉴的作用。

参考文献

- 尹田鹏. 六种云南产乌头属植物的生物碱成分研究[D]. 昆明: 云南大学, 2016.
Yi TP. Study on the alkaloids of six species of aconitum from Yunnan [D]. Kunming: Yunnan University, 2016.
- 袁晓航. 中药川乌与草乌的鉴别比较及药物活性探索[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(18): 137-138.
Yuan XH. Identification and comparison of traditional Chinese medicine Chuan wu and Cao wu and exploration of their drug activity [J]. Inner Mongolia Tradit Chin Med, 2017, 36(18): 137-138.
- 艾嫦, 朱妍妍, 赵长琦. 乌头属植物化学成分、药理作用及其内生菌的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(2): 248-259.
Ai C, Zhu YY, Zhao CQ. Recent advances on chemical constituents, pharmacological study and the endophytes of the genus aconitum [J]. Nat Prod Res Dev, 2012, 24(2): 248-259.
- 黄思瑜, 董宪兵, 邓宇杰. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定酒中的次乌头碱、乌头碱、中乌头碱[J]. 检验检疫学刊, 2019, 29(3): 27-29.
Huang SY, Dong XB, Deng YJ. Rapid determination of hyaconitine, aconitine and mesaconine in wine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Inspect Quar, 2019, 29(3): 27-29.
- 马天宇, 布仁, 俞腾飞. UPLC/Q Exactive MS 检测家兔血浆中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱血药浓度的方法研究[J]. 中药材, 2015, 38(9): 1886-1889.
Ma TY, Bu R, Yu TF. Determination of aconitine, hyaconitine and mesaconitine in rabbit plasma by UPLC/Q Exactive MS [J]. Chin Med Mater, 2015, 38(9): 1886-1889.
- 李君, 张微, 赛那. 紫外-可见分光光度法测定那如-3 药材提取物中乌头碱含量[J]. 北方医药, 2018, 15(12): 1-2.
Li J, Zhang W, Sai N. Determination of aconitine in naru-3 extracts by Uv-Vis spectrophotometer [J]. North Med, 2018, 15(12): 1-2.
- 吴梓春, 刘肖林. 高效液相色谱法同时测定中药附子中乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的含量[J]. 北方医学, 2017, 14(1): 11-14.
Wu ZC, Liu XL. Simultaneous determination of aconitine, mesaconitine and hyaconitine in radix aconiti lateralis high-performance liquid chromatography [J]. North Med, 2017, 14(1): 11-14.
- 刘伟, 沈敏, 吴何坚. 液相色谱-串联质谱法测定生物检材中乌头生物碱[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(12): 2023-2028.
Liu W, Sheng M, Wu HJ. Lc-ms / Ms Determination of aconitum alkaloids in biological samples [J]. J Pharm Anal, 2009, 29(12): 2023-2028.
- 滕傲雪, 王瑞花, 何洪源, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定血液中 5 种乌头类生物碱[J]. 理化检验化学分册, 2018, 54(8): 941-945.
Teng AX, Wang RH, He HY, et al. Simultaneous determination of five aconitum alkaloids in blood by High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chem Phys Exam, 2018, 54(8): 941-945.
- 张园, 陈波, 张美玲. 超高效液相色谱-质谱联用测定生物检材中乌头碱[J]. 中国法医学杂志, 2018, 33(1): 68-70.
Zhang Y, Chen B, Zhang ML. Determination of aconitine in biological samples by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Forensic Med, 2018, 33(1): 68-70.
- 马芳, 赵东, 吴晓霞. 利用 LC/MS/MS 方法检测附子水提液中乌头碱的含量方法学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 95-96.
Ma F, Zhao D, Wu XX. The content of aconitine in Aconite aqueous extract was determined by LC/MS/MS [J]. Chin J Exp Pharm, 2011, 17(13): 95-96.
- 钟世豪, 任听听, 于忠山. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定血液中 4 种乌头类生物碱[J]. 理化检验(化学分册), 2019, 55(5): 591-596.
Zhong SH, Reng XX, Yu ZS. Determination of four aconitum alkaloids in blood by QuEChERS-High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Phys Chem Exam (Chem Sect), 2019, 55(5): 591-596.
- 罗兰, 刘红河, 王甫. 超高效液相色谱-串联质谱法测定人尿中 23 种生物碱[J]. 预防医学情报杂志, 2019, 35(8): 832-839.
Luo L, Liu HH, Wang F. Determination of 23 alkaloids in human urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Prev Med Intell, 2019, 35(8): 832-839.
- 贲彩红. 中药制剂乌头碱含量测定[J]. 河南中医, 2017, 37(7): 436-438.

Ben CH. Determination of aconitine in traditional Chinese medicine preparation [J]. Henan Trad Chin Med, 2017, 37(7): 436-438.

[15] 袁玥, 林洁. 超高效液相色谱-飞行时间质谱法定性定量检测乌头类植物中 14 种乌头生物碱及其代谢产物的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(21): 5653-5658.

Yuan Y, Lin J. Determination of 14 aconitum alkaloids and their metabolites in *Aconitum* L. by high-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry method [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(21): 5653-5658.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



赵 丽, 中级技师, 主要研究方向为水和食品中有机污染物检测。
E-mail: 417640514@qq.com



师真, 中级技师, 主要研究方向为水和食品中有机污染物检测。
E-mail: 403908568@qq.com



“食品保鲜与贮藏”专题征稿函

食品保鲜与贮藏对保障食品的品质具有重要意义, 越来越得到国内外学者的广泛关注。

鉴于此, 近期本刊特别策划了“食品保鲜与贮藏”专题, 主要围绕(1)果蔬、粮食、水产品、禽肉制品等食品保鲜方法、技术; (2)食品在储藏中的生理、生化变化; (3)食品腐败以及控制方法等或您认为有意义的领域展开讨论, 计划在 2020 年 7~8 月出版。

我们去年也组织过此专题, 由上海海洋大学的谢晶教授担任专题主编, 于 5 月见刊, 专题共收录文章 17 篇, 各方面反响都很不错。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及编辑部全体成员特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2020 年 5 月 10 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**食品保鲜与贮藏**):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: **食品保鲜与贮藏**”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: **食品保鲜与贮藏**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部