

超高效液相色谱-串联质谱法同时检测中药材及植物性食品中 23 种有毒生物碱

廖仕成¹, 李荷丽^{2*}, 刘红河¹, 方舒正², 秦逍云¹

(1. 深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518055; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

摘 要: **目的** 建立一种超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定中药材及植物性食品样品中 23 种有毒生物碱的检测方法。**方法** 样品用氢氧化钠调节 pH 至 7.5, 加入硼砂-氢氧化钠缓冲液, 乙酸乙酯萃取, 氮吹近干后, 用 UPLC-MS/MS 法同时对 23 种生物碱进行定性定量分析, 外标法定量。**结果** 在相应的质量浓度范围内, 23 种生物碱在不同基质样品中均有良好的线性关系, 相关系数在 0.9989~0.9999。全部样品回收率为 61.2%~107.3%, 相对标准偏差为 1.1%~8.4%。各类样品检出限为 0.01~0.40 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 0.03~1.33 $\mu\text{g/kg}$ 。**结论** 本方法简单、准确、快速, 可实现 23 种常见生物碱的多组分同时测定, 为生物碱中毒的快速筛查和确证提供了检测时间上的优势, 可用于疑似中药材和植物性食品生物碱中毒的应急事件处理, 并为临床治疗提供技术支撑。

关键词: 生物碱; 超高效液相色谱-串联质谱法; 中药材; 植物性食品

Simultaneous determination of 23 kinds of toxic alkaloids in Chinese medicinal materials and plant-derived food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIAO Shi-Cheng¹, LI He-Li^{2*}, LIU Hong-He¹, FANG Shu-Zheng², QIN Xiao-Yun¹

(1. Shenzhen District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China;
2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 23 kinds of toxic alkaloids in Chinese medicinal materials and plant-derived food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Firstly, the pH of the samples was adjusted to 7.5 by sodium hydroxide, and then boric acid-sodium hydroxide buffer solution was added, and extracted by ethyl acetate, which followed by concentrated with nitrogen, and detected by UPLC-MS/MS, quantified with external standards. **Results** The calibration curves of 23 kinds of alkaloids showed good linearities in the corresponding range of mass concentration with correlation coefficients of 0.9989–0.9999. The recoveries of all samples were 61.2%–107.3%, and the RSDs were 1.1%–8.4%, with the limits of detection from 0.01 to 0.40 $\mu\text{g/kg}$ and the limits of quantitation from 0.03 to 1.33 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** This method is rapid, sensitive and accurate, which can realize the simultaneous

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目(2020MK173)、深圳市医学重点学科资助项目(SZXX066)

Fund: Supported by the Science and Technology Program of the State General Administration of Market Supervision and Administration (2020MK173), and the Shenzhen Key Medical Discipline (SZXX066)

***通信作者:** 李荷丽, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: liheli1234@126.com

***Corresponding author:** LI He-Li, Ph.D, Assistant Professor, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, No.11, Ronghua South Road, Daxing District, Beijing 100176, China. E-mail: liheli1234@126.com

determination of 23 kinds of common alkaloids, and provides the time advantage of detection for the rapid screening and confirmation of alkaloid poisoning, and the method could be used for emergency treatment of alkaloid poisoning from suspected Chinese medicinal materials and plant-derived foods, and provides technical support for clinical treatment.

KEY WORDS: alkaloids; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Chinese medicinal materials; plant-derived foods

0 引言

生物碱(alkaloids)是一类对人和动物具有强烈生理作用的含氮有机化合物,大多数为含氮的复杂环状结构,能与酸作用生成盐,易溶于水,是许多中草药中的有效成分之一^[1],具有高效的药理作用和毒性作用^[2-5]。生物碱具有抗恶性肿瘤、抗炎镇痛等功用^[6-8],但某些生物碱具有较强的毒性,人们常因为用药过量、误食或误服导致中毒或死亡^[9-11]。含有毒生物碱植物或药材分布广泛^[12-13],世界各地每年均有生物碱中毒事件的发生,有误食野生植物后引发的中毒,也有因中药材煲汤引起生物碱中毒,一般表现为散发型中毒。不同的生物碱中毒症状不同,一般可分为舌咽部针刺样疼痛、上腹部烧灼疼痛等上消化系统症状^[14]和肠源性青紫病等下消化系统症状^[15]。有些生物碱除了可导致上述共同症状外,还对动物器官有特定的毒性,如藜芦类生物碱可对心脏和脑细胞产生 DNA 损伤^[15],千里光类生物碱对肝脏有较强的毒性^[16]。

目前有关有毒生物碱检测的国家标准方法有 GB/T 5009.36—2003《粮食卫生标准的分析方法》和 GB 19641—2015《食品安全国家标准 食用植物油料》中的化学显色法和薄层色谱法,但方法灵敏度和特异性均较差,只能对某类生物碱进行定性筛查,无法精确定量。文献报道的其他检测方法主要有化学比色法、紫外分光光度法、高效液相色谱法^[17-19]、气相色谱-串联质谱法^[20-21]、液相色谱-串联质谱法等^[22-24]。化学比色法、紫外分光法需要显色剂等帮助,操作烦琐、灵敏度不高;高效液相色谱法通用性强,但特异性弱,性质相近的生物碱不易区分;气相色谱-串联质谱法可针对多种生物碱进行检测,但待测物需气化后检测,不适合大分子量或不易气化的生物碱检测,具有一定的局限性。目前针对生物碱中毒,缺乏灵敏度高、特异性好且权威有效的国家标准检测方法和相关文献,导致检测机构在中毒事件涉及法律问题处于被动状态。鉴于此,亟须建立一种灵敏度高和特异性好的多种生物碱快速而准确的测定方法用于应对突发应急事件。本研究在借鉴以往文献提取、净化等前处理方法的基础上^[25-28],拟建立植物性食品及中药材中 23 种常见生物碱的超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定方法,以期有关生物碱引起中毒应急

筛查和确证检测提供方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

23 种生物碱标准品:毒扁豆碱(eserine, CAS 号 57-47-6, 纯度 99.1%)、阿托品(atropine, CAS 号 51-55-8, 纯度 100.0%)、东莨菪碱(hyoscyne, CAS 号 51-34-3, 纯度 99.5%)、山莨菪碱(racanisodamine, CAS 号 17659-49-3, 纯度 99.5%)、钩吻碱(gelsemine, CAS 号 509-15-9, 纯度 98.8%)、土的宁(strychnine, CAS 号 57-24-9, 纯度 98.1%)、马钱子碱(brucine, CAS 号 357-57-3, 纯度 98.1%)、秋水仙碱(colchicine, CAS 号 64-86-8, 纯度 99.2%)、塔拉弟胺(talatisamine, CAS 号 20501-56-8, 纯度 98.3%)、藜芦碱(jervine, CAS 号 469-59-0, 纯度 99.4%)、次乌头碱(hypaconitine, CAS 号 6900-87-4, 纯度 98.2%)、草乌甲素(bulleyaconitine A, CAS 号 107668-79-1, 纯度 99.3%)、中乌头碱(mesaconitine, CAS 号 2752-64-9, 纯度 99.4%)、乌头碱(aconitine, CAS 号 302-27-2, 纯度 98.0%)、雷公藤吉碱(wilforine, CAS 号 37239-47-7, 纯度 98.1%)、雷公藤次碱(wilforine, CAS 号 11088-09-8, 纯度 98.6%)、血根氯铵(sanguinarium chloride, CAS 号 5578-73-4, 纯度 98.3%)(美国 Quality Control Chemicals 公司);毒芹碱(DL-coniine, CAS 号 3238-60-6, 纯度 98%)、千里光非灵(seneciophylline, CAS 号 480-81-9, 纯度 99.5%)、倒千里光碱(retrorsine, CAS 号 480-54-6, 纯度 99.0%)、藜芦次碱(veratridine, CAS 号 71-62-5, 纯度 99.4%)(美国 CFW labs 公司); α -茄碱(α -solanine, CAS 号 20562-02-1, 纯度 98.6%)、 α -卡茄碱(α -chaconine, CAS 号 20562-03-2, 纯度 99.1%)(美国 ChromaDex 公司)。

乙腈、甲醇、甲酸、甲酸铵、乙酸乙酯、乙酸、乙酸铵、三氯甲烷(色谱纯,德国 Merck 公司);氨水、氢氧化钠(优级纯,美国 CNW 公司);硼砂($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)(分析纯,广州化学试剂厂)。

硼砂-氢氧化钠缓冲液(pH 9.6)配制方法:储备液 A: 0.05 mol/L 的硼砂,称取 19.05 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 用水配成 1000 mL;储备液 B: 0.2 mol/L 的氢氧化钠,称取 8.0 g 氢氧化钠用水配成 1000 mL。使用时取 A 液 50 mL 和 B 液 23.0 mL 混合,加水定容至 200 mL。

磷酸盐缓冲液(pH 8.0)配制方法:取磷酸氢二钾 5.59 g,与磷酸二氢钾 0.41 g,用水配成 1000 mL。

植物性食品:五指毛桃广东清补凉汤料、五指毛桃茯

苓汤料等; 中药材: 疑似中毒送检中药材样品川乌等。

仪器: API QTRAP 4500 串联三重四极杆质谱仪(美国 AB Sciex 公司); Shimadzu LC-20A 超快速液相色谱仪(日本岛津公司); peek Infinity 1031 氮气发生器(英国 peek 公司); XS-205DU 十万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-250DV 超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); Allegra X-22R 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); Turbo VapII 型吹氮浓缩仪(美国 Caliper 公司); MS3 型漩涡振荡器(德国 IKA 公司); Oasis-HLB 固相萃取柱(3 cc, 60 mg, 美国 Waters 公司); DIKMA Leapsil C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 2.7 μm)、Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、0.22 μm 有机针筒式微孔滤膜过滤器(北京 DIKMA 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制

分别精确称取 23 种生物碱标准品 0.0100 g, 加入 1.0 mL 10%甲酸溶液, 使生物碱溶解, 再用甲醇定容于 10 mL 棕色容量瓶中, 配成质量浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液, -20 ℃避光保存。准确移取 100 μL 1.0 mg/mL 各标准储备液于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇稀释定容, 配成 10.0 mg/L 的 23 种生物碱混合标准中间溶液, -20 ℃避光保存。临用时, 将 10.0 mg/L 的混合标准中间溶液用水稀释为 1.0 mg/L 的混合使用液。

1.2.2 样品前处理

取植物性食品或中药材 5 g 左右(精确到 0.001 g)于 50 mL 离心管, 加入 10 mL 硼砂-氢氧化钠缓冲液(pH 9.6), 混匀后在 37 ℃水浴放置 30 min 充分浸泡, 超声提取 30 min, 5000 r/min 离心 5 min, 取 2 mL 上清液于 15 mL 离心管中,

加入 5 mL 乙酸乙酯, 激烈振摇提取 15 min, 以 5000 r/min 离心 5 min, 取有机层; 重复提取一次, 合并有机层, 在 45 ℃水浴中以氮气吹至近干, 加入 1 mL 初始流动相溶解, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 待 UPLC-MS/MS 分析。

空白基质溶液制备: 另取经检测不含 23 种生物碱的空白植物性食品和空白中药材, 按前述样品前处理方法处理后待用。

1.2.3 色谱-质谱条件

(1)色谱条件: 色谱柱为 DIKMA Leapsil C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1mm, 2.7 μm); 流动相为 A: 0.1%乙酸和 2 mmol/L 乙酸铵的水溶液, B: 0.1%乙酸和 2 mmol/L 乙酸铵的乙腈溶液; 进样量: 5 μL; 流速: 0.3 mL/min; 柱温 40 ℃。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution programs

时间/min	A/%	B/%
0.00	90	10
2.00	80	20
5.00	50	50
6.00	10	90
10.10	90	10

(2)质谱条件: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 正离子模式; 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 离子源温度: 550 ℃; 喷雾电压: 4500 V, 入口电压 10 V; 气帘气压力 20.0 psi; 碰撞气流速为中等; 源内气压力 55.0 psi, 辅助气压力 55.0 psi; 驻留时间 40 ms; 23 种生物碱类定性离子和定量离子等质谱参数见表 2。

表 2 23 种生物碱类质谱参数等信息
Table 2 Mass spectrometric parameters and other information for 23 kinds of alkaloids

化合物	CAS 号	保留时间/min	分子量/Da	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/V
毒芹碱	3238-60-6	3.75	127.23	128.1	69.0*/55.0	21
山莨菪碱	17659-49-3	4.12	305.37	306.1	140.1*/122.1	34
东莨菪碱	51-34-3	4.30	303.35	304.1	138.1*/156.1	24
倒千里光碱	480-54-6	4.37	351.39	352.1	324.2*138.1	36
钩吻碱	509-15-9	4.39	322.40	323.1	236.1*/218.1	36
毒扁豆碱	57-47-6	4.50	275.35	276.1	219.1*/162.1	15
马钱子碱	357-57-3	4.63	394.46	395.2	324.1*/244.1	42
千里光非灵	480-81-9	4.65	333.38	334.2	306.1*/138.1	34
土的宁	57-24-9	4.66	334.41	335.1	184.0*/156.0	48
阿托品	51-55-8	4.78	289.37	290.1	124.1*/93.0	31
塔拉弟胺	20501-56-8	4.80	421.57	422.2	390.2*/358.2	39
雷公藤次碱	11088-09-8	5.76	867.85	868.5	722.5*/706.6	94
α-茄碱	20562-02-1	5.80	868.06	868.6	398.3*/722.5	94
α-卡茄碱	20562-03-2	5.85	852.06	852.6	706.5*/98.0	95
藜芦碱	469-59-0	6.01	425.60	426.3	313.2*/114.0	38
血根氯铵	5578-73-4	6.08	367.78	332.0	304.0*/274.0	37
秋水仙碱	64-86-8	6.21	399.44	400.2	358.2*/326.1	29
藜芦次碱	71-62-5	6.38	673.79	674.8	456.3*/474.3	66

表 2(续)

化合物	CAS 号	保留时间/min	分子量/Da	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/V
中乌头碱	2752-64-9	6.64	631.71	632.2	572.2*/540.3	45
乌头碱	302-27-2	6.95	645.74	646.4	586.3*/554.3	45
次乌头碱	6900-87-4	7.00	615.71	616.3	556.3*/524.3	45
草乌甲素	107668-79-1	7.16	627.76	644.3	584.4*/552.3	45
雷公藤吉碱	37239-47-7	8.01	857.81	858.3	686.3*/840.3	45

注: *定量离子(quantitative ion)。

2 结果与分析

2.1 前处理条件的选择

大多数生物碱在碱性条件下易溶于有机溶剂，而在酸性条件转化成盐类溶于水。根据这一性质，将样品溶液调至偏碱性，生物碱转化为游离态生物碱，用有机溶剂进行提取。23 种目标生物碱结构不同，导致各物质之间极性有一定差异，在不同溶剂中的溶解度有所不同。阿托品极性较大，雷公藤次碱、雷公藤吉碱极性相对较小。本研究考察乙酸铵-氨水(pH 9.0)、硼砂-氢氧化钠(pH 9.6)、磷酸盐缓冲液(pH 8.0)等不同提取剂的提取效率。结果表明，乙酸铵-氨水(pH 9.0)的平均回收率在 74.0%~82.2%，但提取液中干扰杂质的去除效果略差，基质干扰较大，血根氯铵的回收率较低；磷酸盐缓冲液(pH 8.0)的平均回收率在 62.7%~70.4%，对于雷公藤次碱、乌头碱类等弱碱性生物碱的提取回收率略低；硼砂-氢氧化钠缓冲液(pH 9.6)对大多数生物碱的提取回收率均较高，各生物碱平均回收率在 79.3%~92.4%之间。生物碱是碱性物质，随着 pH 的升高，各生物碱更容易被提取。因此本研究最终确定采用 pH 9.6 的硼砂-氢氧化钠缓冲液提取。

本研究比较了 HLB 固相萃取小柱、三氯甲烷和乙酸乙酯 3 种净化方式。结果表明，用 HLB 固相萃取小柱净化效果较差，平均回收率只有 20%~60%，而且采用固相萃取小柱净化操作复杂费时，不利于突发应急事件的快速处置；三氯甲烷和乙酸乙酯提取净化效果较好，回收率在 61.2%~107.3%，考虑三氯甲烷毒性较大，最终选择用乙酸乙酯净化方式。

2.2 色谱条件的优化

考虑到生物碱的性质，本研究比较了适合分离碱性物质的氨基柱和 C₁₈ 柱对目标化合物的分离效果。按 1.2.2 处理后，采用上文所述 A: 含 0.1%乙酸-2 mmol/L 乙酸铵水溶液和 B: 0.1%乙酸-2 mmol/L 乙酸铵乙腈溶液作为流动相，分别采用 BEH 氨基柱和 C₁₈ 柱进行分离后上机测试，目标物质的 MRM 色谱图见图 1。图 1 显示，C₁₈ 柱的分离效果优于氨基柱，大部分目标物质峰形好，故选定 C₁₈ 柱作为分析色谱柱。

分别采用甲醇、乙腈作为有机相，不同浓度的乙酸铵水溶液作为水相，测试不同流动相对生物碱的分离效果。0.1%乙酸-2 mmol/L 乙酸铵的乙腈溶液和 0.1%乙酸-2 mmol/L 乙酸铵的水溶液条件下，采用梯度洗脱进行分离，23 种生物碱均有较尖锐对称的峰形和较好的分离度，故以此为洗脱条件。

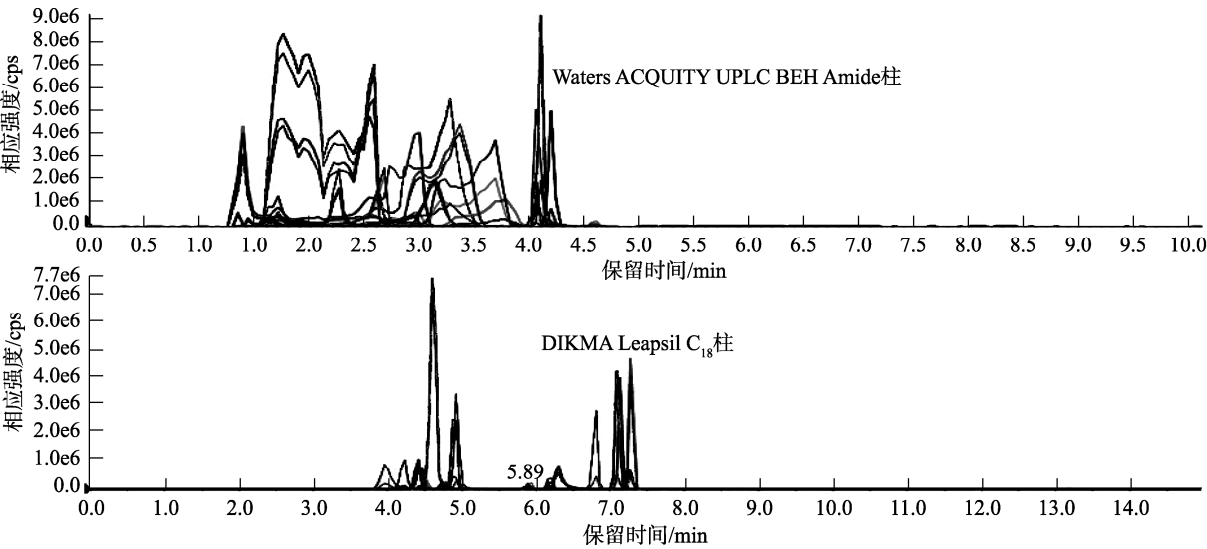


图 1 Amide 柱与 C₁₈ 柱测定生物碱的 MRM 色谱对比图
Fig.1 Comparison of chromatograms for alkaloids between Amide column and C₁₈ column

2.3 质谱参数的优化

生物碱大多数为含氮碱基的化合物, 易得到质子形成 $[M+H]^+$ 离子, 适合在 ESI 源正离子 $[ESI(+)]$ 模式下进行检测。在 ESI(+) 模式下连续直接进样, 分别对喷雾电压、离子源温度、入口电压、气帘气压力、碰撞气压力、源内气压力、辅助气压力和碰撞池电压等质谱参数进行了优化, 以确定 23 种生物碱的母离子和子离子, 优化后各生物碱的质谱参数见表 2, 优化条件下 23 种生物碱的离子色谱图见图 2。

2.4 方法的线性范围及检出限

由于基质效应差别很小, 本研究用中药材空白基质曲线作为基质曲线。取 23 种生物碱标准混合使用液, 用 1.2.2 中制备的空白基质溶液定容至 1 mL, 使各生物碱的最终质量浓度依次为 0.0、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、70.0、100.0 $\mu\text{g/L}$ 进样测定。以峰面积为纵坐标(Y), 各生物碱标准系列质量浓度为横坐标(X, $\mu\text{g/L}$), 绘制基质标准曲线。各生物碱的线性方程、线性范围、相关系数如表 3 所示。

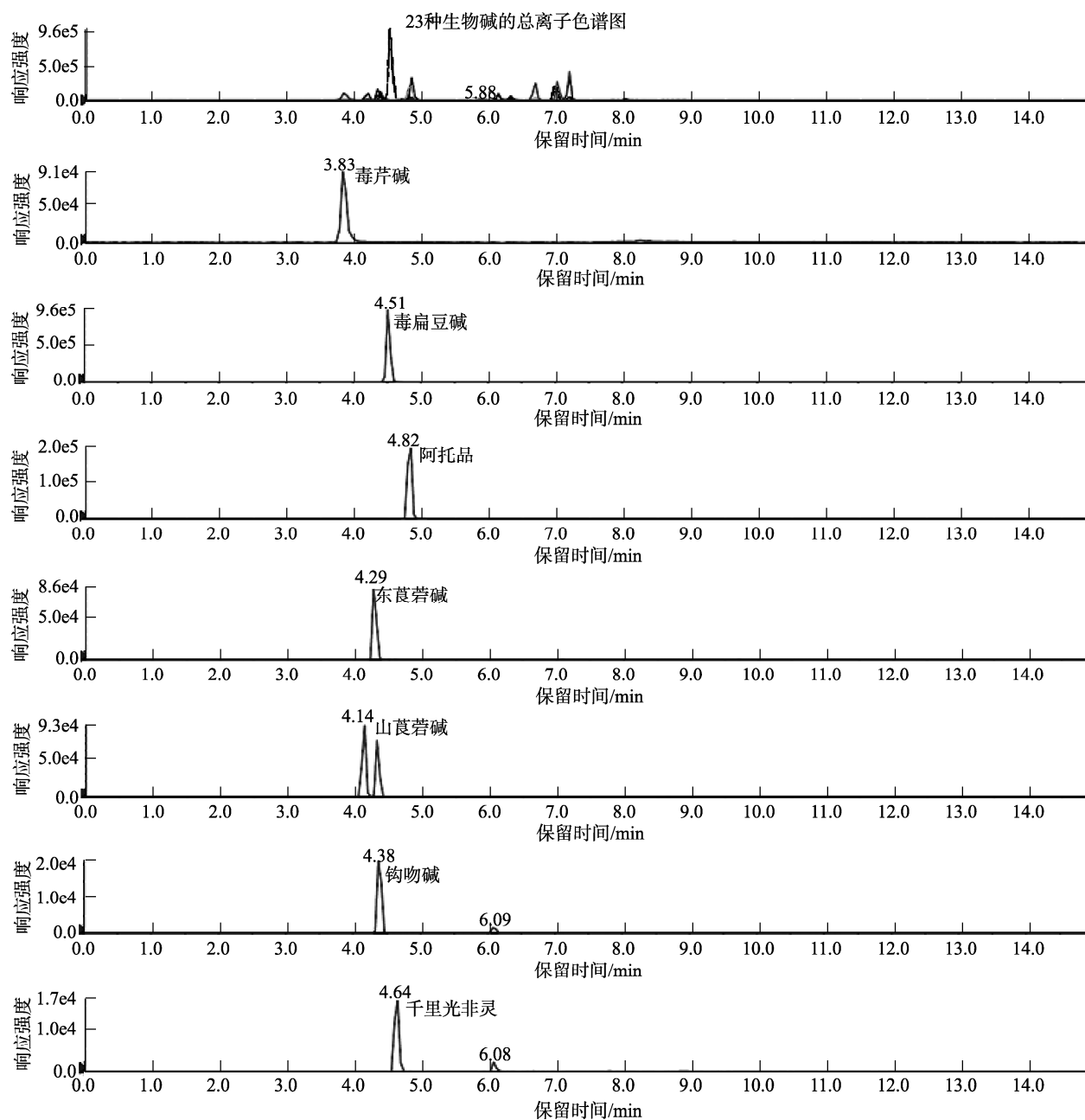


图 2 条件优化后 23 种生物碱的离子色谱图

Fig.2 Chromatograms of 23 kinds of alkaloids under optimized conditions

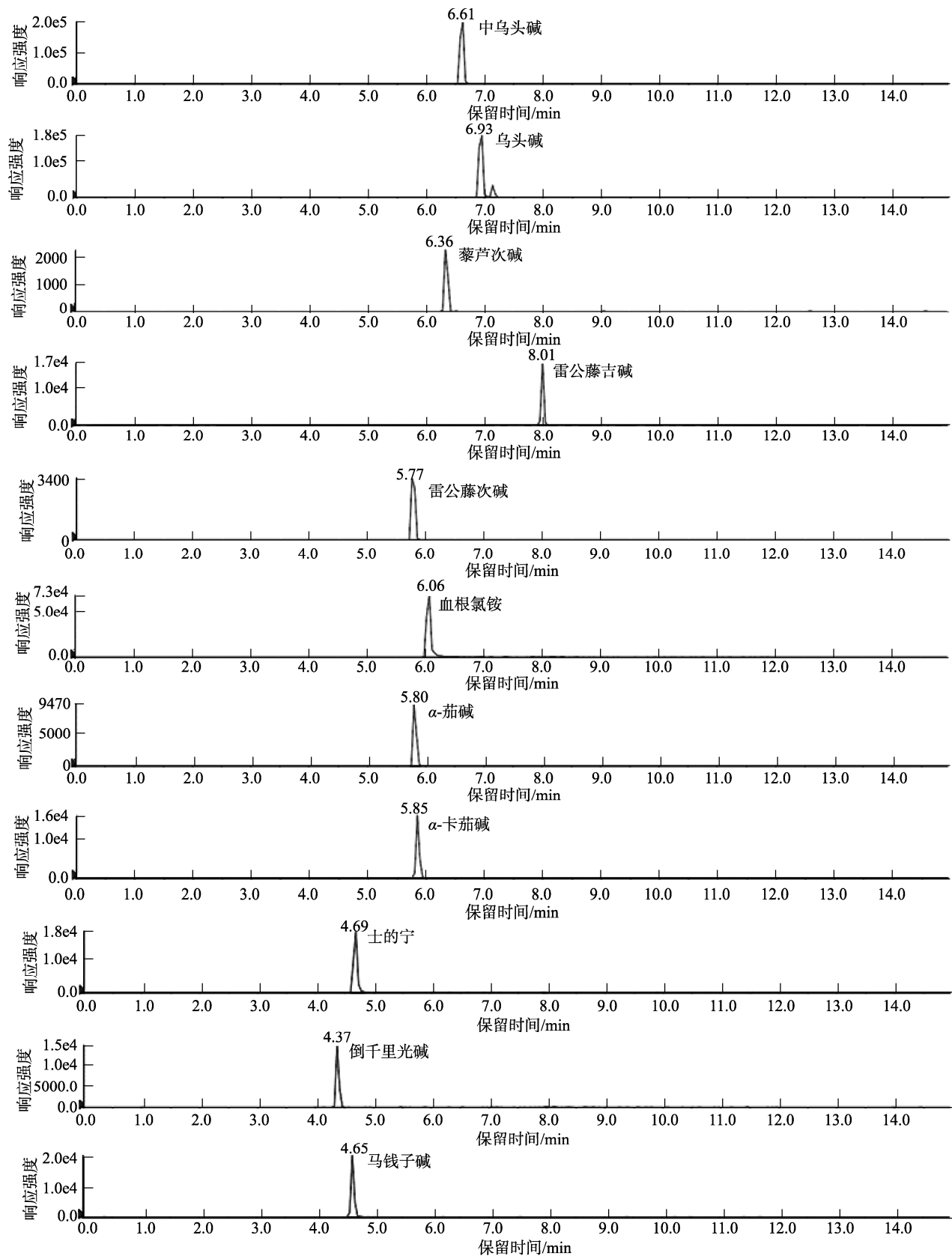


图 2(续) 条件优化后 23 种生物碱的离子色谱图
Fig.2 Chromatograms of 23 kinds of alkaloids under optimized conditions

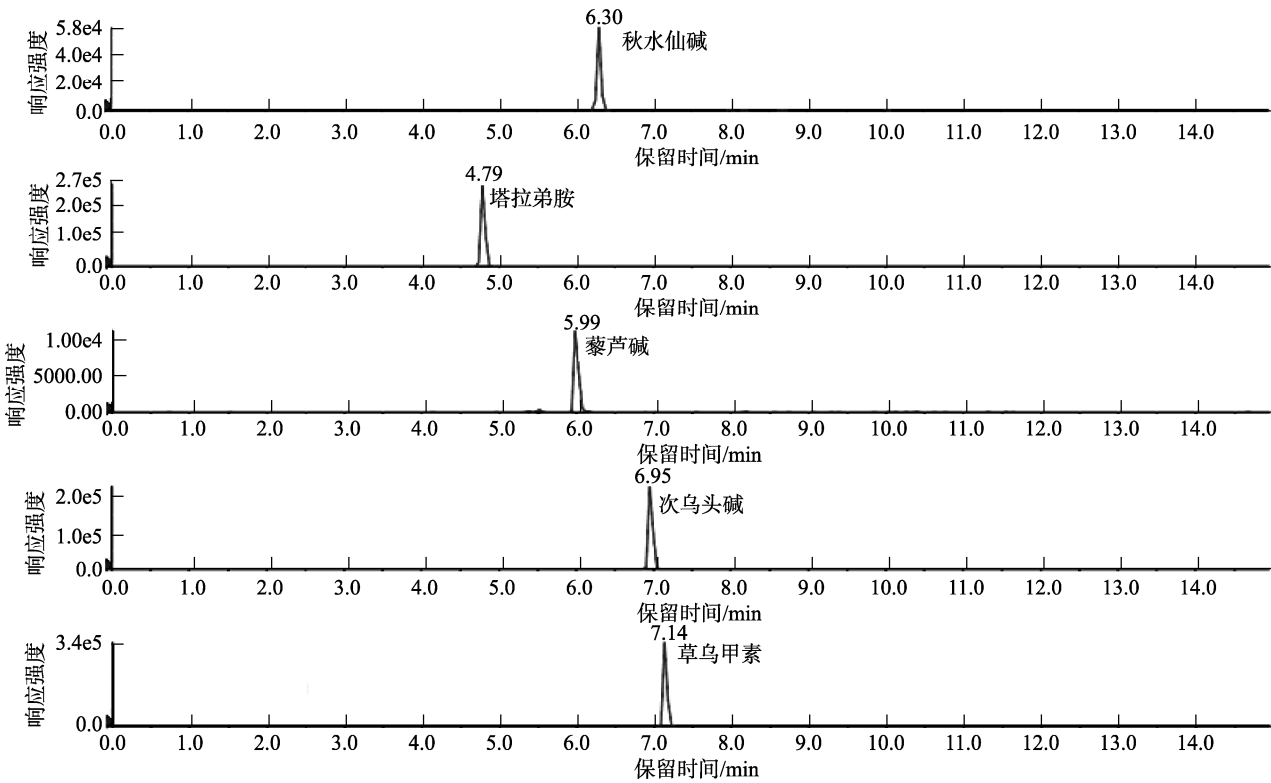


图 2(续) 条件优化后 23 种生物碱的离子色谱图
Fig.2 Chromatograms of 23 kinds of alkaloids under optimized conditions

表 3 23 种有毒生物碱的线性方程、线性范围和相关系数

Table 3 Linear equations, linear ranges and correlation coefficients (r) of 23 kinds of alkaloids

化合物	线性方程	线性范围 /($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (r)
毒芹碱	$Y=6.14\times10^4X-1.07\times10^4$	1.0~100	0.9995
山莨菪碱	$Y=5.90\times10^4X-7.38\times10^3$	0.04~100	0.9997
东莨菪碱	$Y=5.40\times10^4X+1.97\times10^4$	0.1~100	0.9991
倒千里光碱	$Y=7.30\times10^3X+1.67\times10^1$	0.6~100	0.9993
钩吻碱	$Y=1.47\times10^4X+1.14\times10^4$	0.1~100	0.9989
毒扁豆碱	$Y=4.22\times10^5X+2.84\times10^4$	0.1~100	0.9995
马钱子碱	$Y=1.16\times10^4X-5.86\times10^3$	0.2~100	0.9993
千里光非灵	$Y=1.22\times10^4X+5.95\times10^3$	0.2~100	0.9995
土的宁	$Y=1.16\times10^4X+4.91\times10^3$	0.5~100	0.9990
阿托品	$Y=1.55\times10^5X+1.87\times10^4$	0.05~100	0.9992
塔拉弟胺	$Y=1.30\times10^5X+1.66\times10^4$	0.03~100	0.9989
雷公藤次碱	$Y=3.19\times10^3X-3.08\times10^3$	1.0~100	0.9997
α -茄碱	$Y=6.47\times10^3X-6.22\times10^2$	1.0~100	0.9999
α -卡茄碱	$Y=1.01\times10^4X-2.75\times10^3$	0.2~100	0.9994
藜芦碱	$Y=6.44\times10^3X-1.95\times10^2$	0.3~100	0.9997
血根氯铵	$Y=5.49\times10^4X-6.11\times10^4$	1.0~100	0.9996
秋水仙碱	$Y=2.75\times10^4X+7.23\times10^3$	0.2~100	0.9996
藜芦次碱	$Y=1.82\times10^3X-4.26\times10^2$	1.0~100	0.9992
中乌头碱	$Y=1.22\times10^5X-1.96\times10^4$	0.06~100	0.9990
乌头碱	$Y=1.43\times10^5X-3.72\times10^4$	0.3~100	0.9993
次乌头碱	$Y=1.19\times10^5X+9.77\times10^4$	0.2~100	0.9997
草乌甲素	$Y=1.48\times10^5X-3.07\times10^4$	0.2~100	0.9996
雷公藤吉碱	$Y=1.06\times10^4X-1.75\times10^3$	0.3~100	0.9995

以 3 倍信噪比($S/N=3$)计算得到 23 种生物碱类的检出限 (limits of detection, LODs)、以 10 倍信噪比($S/N=10$)计算得到 23 种生物碱的定量限(limits of quantitation, LOQs), 中药材中检出限为 0.01~0.30 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 0.03~1.00 $\mu\text{g/kg}$, 植物性食品中检出限为 0.01~0.40 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 0.03~1.33 $\mu\text{g/kg}$ 。由此可见, 此研究建立的 23 种生物碱在中药材和植物性食品中的检测方法检出限和定量限低、方法灵敏度高。详细数据如表 4 所示。

表 4 23 种有毒生物碱的检出限和定量限($\mu\text{g/kg}$)

Table 4 LODs and LOQs of 23 kinds of alkaloids ($\mu\text{g/kg}$)

化合物	中药材		植物性食品	
	检出限	定量限	检出限	定量限
毒芹碱	0.30	1.00	0.30	1.00
山莨菪碱	0.01	0.04	0.01	0.03
东莨菪碱	0.03	0.10	0.03	0.10
倒千里光碱	0.18	0.60	0.25	0.83
钩吻碱	0.03	0.10	0.03	0.10
毒扁豆碱	0.03	0.10	0.02	0.07
马钱子碱	0.05	0.20	0.05	0.17
千里光非灵	0.06	0.20	0.07	0.23
土的宁	0.15	0.50	0.15	0.50
阿托品	0.02	0.05	0.02	0.07
塔拉弟胺	0.01	0.03	0.01	0.03
雷公藤次碱	0.30	1.00	0.40	1.33
α -茄碱	0.30	1.00	0.35	1.17

表 4(续)

化合物	中药材		植物性食品	
	检出限	定量限	检出限	定量限
α -卡茄碱	0.06	0.20	0.15	0.50
藜芦碱	0.08	0.30	0.10	0.33
血根氯铵	0.30	1.00	0.40	1.33
秋水仙碱	0.05	0.20	0.05	0.17
藜芦次碱	0.30	1.00	0.30	1.00
中乌头碱	0.02	0.06	0.04	0.13
乌头碱	0.08	0.30	0.10	0.33
次乌头碱	0.06	0.20	0.10	0.33
草乌甲素	0.05	0.20	0.05	0.17
雷公藤吉碱	0.09	0.30	0.10	0.33

2.5 加标回收率和精密度

取空白中药材及植物性食品样品适量，分别加入 23 种生物碱混合标准使用液，使质量浓度分别为 1.0、5.0、10.0 $\mu\text{g/L}$ ，外标法定量，计算加标回收率和相对标准偏差 (relative standard deviations, RSDs)。结果表明，中药材样品的回收率在 61.2%~107.1%之间，RSDs 为 1.1%~8.4%；植物性食品样品回收率在 62.3%~107.3%之间，RSDs 为 2.2%~8.2%，该法精密度和准确度都较好，能满足各种样品中生物碱残留分析要求。

2.6 实际样品检测

用本研究建立的方法检测了 2018 年深圳市某区疑似引起生物碱食物中毒的中药材 28 份，其中 3 份样品中检出钩吻碱，含量为 26.6~304.1 $\mu\text{g/kg}$ ；1 份样品检出乌头碱，含量为 10.6 $\mu\text{g/kg}$ ；1 份样品检出中乌头碱，含量为 8.8 $\mu\text{g/kg}$ ；1 份样品检出次乌头碱，含量为 13.5 $\mu\text{g/kg}$ ；1 份样品检出血根氯铵，含量为 3.6 $\mu\text{g/kg}$ 。检测结果提示，中药材中存在一定的生物碱污染，特别是钩吻碱，检出率虽然不高，但是含量不低。

3 结 论

本研究建立了 UPLC-MS/MS 同时确证中药材和植物性食品样品中 23 种有毒生物碱的分析方法。样品经硼砂-氢氧化钠缓冲液提取后，再用乙酸乙酯反提取，提取液在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹近干，残渣用流动相溶解后上机测定。本研究的线性范围、检出限、精密度和准确度等技术参数均能达到突发应急确证检测和痕量分析的要求。与已有的文献资料相比^[29-31]，本研究优化了样品前处理方法，覆盖的有毒生物碱目标物种类不同且更多，且本研究所建立的方法快速、准确、灵敏，适合于突发应急事件中 23 种生物碱的快速筛查和高灵敏度痕量确证分析，为植物源性食品和中药材引起的生物碱中毒的诊断和监测提供了有效的技术手段和执法依据。

自然界特别是中药材中生物碱种类复杂，性质不完

全一致，对有毒生物碱的种类、内暴露的标志物、毒性、裂解规律、暴露评估等方面的认识仍有许多不足之处，有待进一步研究。

参考文献

[1] 孟品佳. 有毒生物碱性质与分析[J]. 化学通报, 2010, 73(6): 484-490.
MENG PJ. Properties and analysis of toxic alkaloids [J]. Chemistry, 2010, 73(6): 484-490.

[2] 徐智, 吴德玲, 张伟, 等. 生物碱类化合物的研究进展[J]. 广东化工, 2014, 41(17): 84-85, 108.
XU Z, WU DL, ZHANG W, *et al.* Advances in studies on alkaloids compounds [J]. Guangdong Chem Ind, 2014, 41(17): 84-85, 108.

[3] 杨国勋, 熊娟, 胡金峰. 2017 年中国天然产物化学研究进展(下)[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(6): 637-645.
YANG GX, XIONG J, HU JF. 2017's advanced natural products chemistry researches in China (2) [J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(6): 637-645.

[4] 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 [J]. Nat Prod Res Dev, 2012, 24(2): 248-259.

[5] 柏云娇, 于森, 赵思伟, 等. 生物碱的药理作用及机制研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2013, 29(1): 8-11.
BAI YJ, YU M, ZHAO SW, *et al.* Study on pharmacological effect and mechanism of alkaloids [J]. J Harbin Univ Commer (Nat Sci Ed), 2013, 29(1): 8-11.

[6] MANSOOR TA, BORRALHO PM, LUO X, *et al.* Apoptosis inducing activity of benzophenanthridine-type alkaloids and 2-arylbenzofuran neolignans in HCT116 colon carcinoma cells [J]. Phytomedicine, 2013, 20(10): 923-929.

[7] 吴虹, 韦敏. 植物来源的生物碱抗肿瘤活性及其作用机制研究进展[J]. 医学信息, 2011, 24(9): 6294-6296.
WU H, WEI M. Research progress on anti-tumor activity and mechanism of plant-derived alkaloids [J]. Med Inf, 2011, 24(9): 6294-6296.

[8] 陶炳, 张奥, 蓝蓉. 生物碱类镇痛活性成分及其镇痛机制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 957-960.
TAO B, ZHANG AO, LAN R. Advances in studies on analgesic alkaloids and their analgesic mechanism [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2011, 22(4): 957-960.

[9] BEYER J, DRUMMER OH, MAURER HH. Analysis of toxic alkaloids in body samples [J]. Forensic Sci Int, 2009, 185(1-3): 1-9.

[10] YONG SC, CHOI HW, CHUN BJ, *et al.* Quantitative analysis of aconitine in body fluids in a case of aconitine poisoning [J]. Forensic Sci Med Pat, 2020, 16(2): 330-334.

[11] MATTOCKS A. Role of the acid moieties in the toxic actions of pyrrolizidine alkaloids on liver and lung [J]. Nature, 1970. DOI: 10.1038/228174a0

[12] <https://baike.baidu.com/item/%E7%94%9F%E7%89%A9%E7%A2%B1/1315973?fr=aladdin> [Z].

[13] 张婷, 刘亚峰, 孙册, 等. 液相色谱-串联质谱法测定血中 4 种食源性植物毒素[J]. 理化检验(化学分册), 2018, 54(11): 1299-1302.
ZHANG T, LIU YF, SUN C, *et al.* LC-MS/MS determination of 4 food borne plant toxins in blood [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2018, 54(11): 1299-1302.

- [14] 巩江, 倪士峰, 邱莉惠, 等. 龙葵素的药理-毒理及药用研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(9): 4108–4109.
- GONG J, NI SF, QIU LH, *et al.* Research on the pharmacology and toxicity of solanin [J]. J Anhui Agric Sci, 2009, 37(9): 4108–4109.
- [15] 赵瑜, 陆国才, 张卫东, 等. 藜芦生物碱药理和毒理学研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(3): 240–242.
- ZHAO Y, LU GC, ZHANG WD, *et al.* Research progress in pharmacology and toxicology of veratrol alkaloids [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2008, 19(3): 240–242.
- [16] 王琳, 姜洪芳, 朱羽尧, 等. 葡枝千里光的生物碱进行研究[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 566–568.
- WANG L, JIANG HF, ZHU YY, *et al.* Study on alkaloids of *Senecio filiferus* [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2014, 30(6): 566–568.
- [17] 肖文军, 李勤, 熊兴耀, 等. 高效液相色谱法分析马铃薯中 α -茄碱分析化学[J]. 2011, 39(9): 1459–1460.
- XIAO WJ, LI Q, XIONG XY, *et al.* Detection of α -solanine in potato by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2011, 39(9): 1459–1460.
- [18] 朱定波, 马强, 燕廷, 等. 鲁米诺-铁氰化钾流动注射化学发光体系测定饮用水中 α -茄碱[J]. 食品工业科技, 2012, 33(22): 84–87.
- ZHU DB, MA Q, YAN T, *et al.* Determination of α -solanine in drinking water by flow-injection chemiluminescence system of Luminol and potassium ferricyanide [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(22): 84–87.
- [19] 陶佳晗, 龚晓云, 邹吉利, 等. HPLC 法同时测定麦芽总碱提取物中生物碱及麦黄酮的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 166(1): 102–104.
- TAO JH, GONG XY, ZOU JL, *et al.* Simultaneous determination of alkaloids and tricin in malt extract by HPLC [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 166(1): 102–104.
- [20] 吴惠勤, 张春华, 黄晓兰, 等. 气相色谱-串联质谱法同时检测尿液中 15 种有毒生物碱[J]. 分析测试学报, 2013, 32(9): 1031–1037.
- WU HQ, ZHANG CH, HUANG XL, *et al.* Simultaneous determination of 15 toxic alkaloids in urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2013, 32(9): 1031–1037.
- [21] 冯涛, 陶森, 阮世勇, 等. 基于 GC-MS 技术对钩吻碱食物中毒的应急检测[J]. 现代食品, 2021, (6): 156–160.
- FENG T, TAO S, RUAN SY, *et al.* Emergency detection of a food poisoning by gelsemine by gas chromatography tandem mass spectrometry [J]. Mod Food, 2021, (6): 156–160.
- [22] 张春华, 吴惠勤, 黄晓兰, 等. 液相色谱-电喷雾串联质谱同时检测尿液和胃液中 12 种有毒生物碱[J]. 分析化学, 2012, 40(6): 862–869.
- ZHANG CH, WU HQ, HUANG XL, *et al.* Simultaneous determination of 12 toxic alkaloids in urine and gastric juice using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40(6): 862–869.
- [23] 刘红河, 康莉, 廖仕成, 等. 超高效液相色谱-质谱法测定食物中毒样品中茄碱和卡茄碱[J]. 华南预防医学, 2016, 42(5): 435–442.
- LIU HH, KANG L, LIAO SC, *et al.* Determination of α -solanine and α -chaconine in food poisoning samples by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. South Chin J Prev Med, 2016, 42(5): 435–442.
- [24] 朱定姬, 卢敏萍, 黄克建, 等. 在线固相萃取结合液相色谱-线性离子阱多级质谱法同时检测生物样品中 7 种乌头类生物碱[J]. 色谱, 2016, 34(3): 249–257.
- ZHU DJ, LU MP, HUANG KJ, *et al.* Simultaneous determination of seven aconitum alkaloids in biological samples by liquid chromatography-linear ion trap multistage mass spectrometry coupled with on-line solid phase extraction [J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(3): 249–257.
- [25] MINLU C, RUIJUAN L, YAO W, *et al.* LC-MS/MS determination and urinary excretion study of seven alkaloids in healthy Chinese volunteers after oral administration of Shuanghua Baihe tablets [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 118(1): 89–95.
- [26] VALESE AC, MOLOGNONI L, PLOENCIO LADS, *et al.* A fast and simple LC-ESI-MS/MS method for detecting pyrrolizidine alkaloids in honey with full validation and measurement uncertainty [J]. Food Control, 2016, 67(3): 183–191.
- [27] NG SW, CHING CK, CHAN AY, *et al.* Simultaneous detection of 22 toxic plant alkaloids in human urine and herbal samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2013, 942(24): 63–69.
- [28] CHEN H, MARÍN-SÁEZ J, ROMERO-GONZÁLEZ R, *et al.* Simultaneous determination of atropine and scopolamine in buckwheat and related products using modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2017, 218(3): 173–180.
- [29] MTA C, TM B, HM A, *et al.* A highly sensitive quantification method for 12 plant toxins in human serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry with a quick solid-phase extraction technique [J]. J Pharmaceut Biomed, 2020. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113676
- [30] 赵舰, 程莉, 贺丽迎, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱对药酒中乌头类生物碱的快速筛查与测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(18): 2194–2198.
- ZHAO J, CHENG L, HE LY, *et al.* Rapid screening and determination of toxic alkaloids in medicinal liquor by ultra performance liquid chromatography quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2021, 31(18): 2194–2198.
- [31] 任丹丹, 刘洋, 史晓梅, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定马铃薯中 α -茄碱和 α -卡茄碱[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(24): 8231–8235.
- REN DD, LIU Y, SHI XM, *et al.* Determination of α -solanine and α -chaconine in potato by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(24): 8231–8235.

(责任编辑: 郑 丽 张晓寒)

作者简介



廖仕成, 主管技师, 主要研究方向为食物中毒、食品安全及涉水材料。
E-mail: simonliew@foxmail.com



李荷丽, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: liheli1234@126.com