

LC-MS/MS 法分析调味品中去甲乌药碱

LCMSMS-732

摘要：采用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了调料中去甲乌药碱的定性定量方法。调味品经酸性甲醇提取，反相色谱分离，三重四极杆质谱法测定。结果显示该方法在 0.1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内，线性良好，相关系数 R 均 >0.999；0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 去甲乌药碱保留时间 RSD 为 0.1%，峰面积 RSD 为 1.4%；去甲乌药碱的检出限、定量限分别为 0.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。该方法分析速度快，灵敏度高，适用于调味品中去甲乌药碱含量测定。

关键词：三重四极杆液质联用仪 去甲乌药碱 调味品 兴奋剂

技术特点：

- ❖ 分析速度快，6 分钟即可实现去甲乌药碱定性定量测定。
- ❖ 前处理简单，样品经甲醇提取后直接上机测定。

去甲乌药碱 (Higenamine)，是一种喹啉类生物碱，能增强心肌收缩力，加快心率扩张，对慢性心脑血管有改善作用，在附子、细辛、干荷叶、干莲子、山药、玉竹、花椒、桂皮等均有广泛分布。2017 年，世界反兴奋剂中心 (WADA) 发布了《禁用清单》，去甲乌药碱属于 S3 类 β_2 激动剂类兴奋剂，禁止运动员在所有场合使用去甲乌药碱。由于去甲乌药碱广泛分布在多种植物中，已有报道，食品、营养品、药品和化妆品中检测出去甲乌药碱。因此，国家体育总局发布了《大型赛事食源性兴奋剂防控指南》，发布了去甲乌药碱阳性的风险防控

指南，并提供了含去甲乌药碱的药品清单，共 408 种。此外含波叶青牛胆、附子、乌头、乌药、细辛、莲子、莲子心、释迦的药品、营养品和食品也应当禁用。指南规定，去甲乌药碱的检出限 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前，去甲乌药碱的检测方法以的检测方法以液相色谱 - 串联质谱法、气相色谱 - 质谱联用法为主，尚未见相关检测标准。本文建立了去甲乌药碱的液相色谱 - 串联质谱测定方法。该方法快速、准确、灵敏度高，供相关行业参考。

实验部分

1.1 仪器配置

岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪联用系统 LCMS-8045。具体配置为

输 液 泵：	LC-40D XR×2	系 统 控 制 器：	CBM-40
自 动 进 样 器：	SIL-40C XR	三 重 四 极 杆 质 谱 仪：	LCMS-8045
柱 温 箱：	CTO-40C	色 谱 工 作 站：	LabSolutions Ver. 5.113

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱：Shim-pack GISS-HP (100 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm)，
岛津 (上海) 实验器材有限公司，P/N: 227-30084-02

流 动 相：A 相 -0.1% 甲酸 5mM 乙酸铵水溶液；
B 相 - 甲醇

流 速：0.3 mL/min

柱 温：40°C

洗 脱 方 式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，
时间程序见表 1。

进 样 量：0.5 μL

洗 针 模 式：水：甲醇 (1: 1)

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	30
3.00	Pumps	Pump B Conc.	80
4.00	Pumps	Pump B Conc.	20
6.00	Controller	Stop	

质谱条件

质谱仪：LCMS-8045	脱溶剂管温度：150°C
离子源：ESI+(1.0kV)	加热模块温度：400°C
雾化气：氮气 3 L/min	接口温度：400°C
干燥气：氮气 5 L/min	扫描模式：MRM
加热气：空气 15 L/min	MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

序号	中文名	前体离子(m/z)	产物离 (m/z)	CE (V)
1	去甲乌药碱	272.00	107.00*	-25
			161.00	-17
			255.00	-15

* 定量离子对

1.3 样品前处理

准确称取 0.5 g 花椒粉末，加入 50.0 mL 甲醇（含 0.1% 甲酸），13500 rpm 均质 30 s，超声提取 5 min，4000 rpm 离心 10 min，取上清液，过 0.22 μm 滤膜，上机测定。

1.4 标准溶液制备

标准系列工作液的配制：取母液适量，配制成浓度为 0.1、0.2、0.5、1、2 μg/mL 的标准工作曲线，待上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

去甲乌药碱含有酚羟基和 N 杂环，在正负模式均有电离，正离子模式 [M+H]⁺ m/z 272.05，负离子模式 [M-H]⁻ m/z 270.15，综合考虑色谱分离及电离影响，选择 ESI+ 模式，正离子模式 m/z 272.05 二级质谱图，如下图 1 所示。此外，双通模式，对加热气、接口温度、DL 温度、加热块温度、干燥气和接口电压进行了单因素优化。结果显示，加热气 15 L/min、接口温度 400°C、DL 温度 150°C、干燥气 5 L/min、接口电压为 1.0 kV 时响应强度更高，是默认参数的 3 倍。

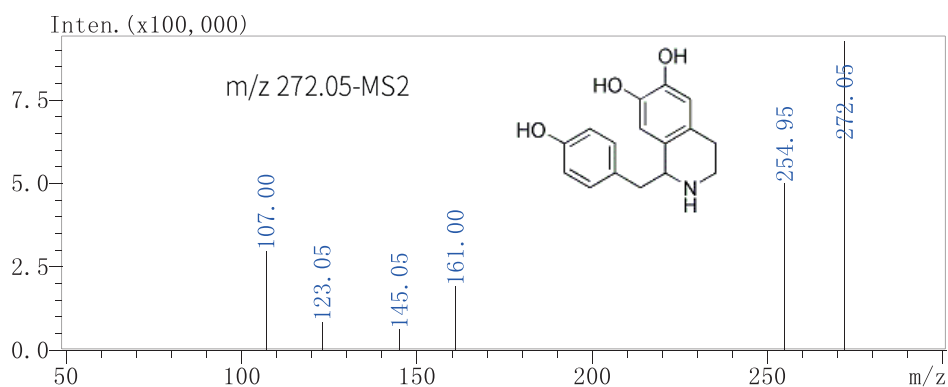


图 1 去甲乌药碱二级质谱图 (CE=-15 eV)

2.2 前处理考察

本文对 dSPE（含无水硫酸镁 1200 mg，N - 丙基乙二胺 300 mg，十八烷基硅烷键合硅胶 100 mg）、HLB 两种净化方式进行了考察，结果显示，去甲乌药碱与通道干扰分离良好，净化对基质效应没有改善，净化前后响应强度没有明显改变。建议有条件时使用 HLB 模式净化，以减缓质谱污染。

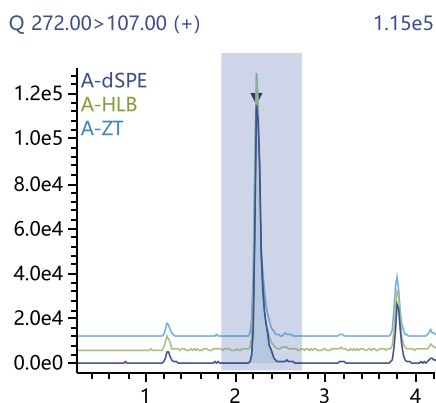


图 2 5 ng/mL 基质加标样品的 MRM 色谱图

2.3 线性及灵敏度

按照 1.4 方法配制标准系列溶液，上机分析得出去甲乌药碱线性范围和线性关系。结果表明，去甲乌药碱在 0.1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内，线性良好，相关系数 R 均 >0.999，准确度 88.7%~102.9% 之间。去甲乌药碱校准曲线见图 3。根据信噪比，计算其检出限 (S/N=3) 和定量限 (S/N=10) 分别为 0.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 和 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

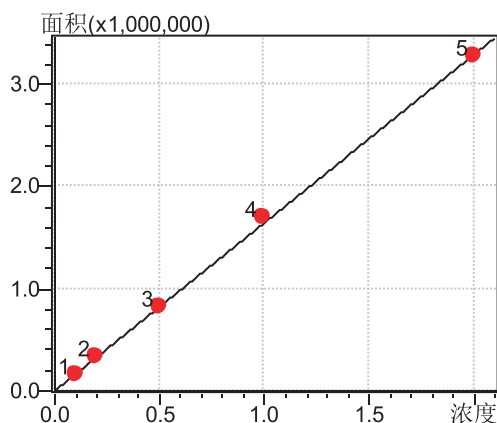


图 3 去甲乌药碱校准曲线

2.4 精密度考察

0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液，注入液相色谱串联质谱仪，平行测定 6 次，计算保留时间 (R.T.) 和峰面积 (Area) 的 RSD%。结果显示，去甲乌药碱保留时间 RSD 为 0.1%，峰面积 RSD 为 1.4%，实验结果表明仪器条件稳定性良好。

2.5 实际样品含量测定

由于去甲乌药碱是内源性成分，无法获得不含待测成分的空白基质，本文采用标准添加法测定含量。向样品 1 提取液中加入一定量的去甲乌药碱母液，使加标浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，根据单点外标法，计算出样品 1 加标前的浓度， $574004/826180 \times 0.5 \mu\text{g}/\text{mL} = 0.35 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；同时根据加标前后的浓度差值，计算出定量准确度为 $(0.94 - 0.35)/0.5 \times 100\% = 119\%$ 。

表 3 样品测定结果

测试	液标 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	样品 1	样品 1+0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	样品 1	样品 1+0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	面积	面积	面积	浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$	浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$
平行 1	837,631	568,377	1,539,714	0.34	0.92
平行 2	814,729	579,631	1,574,532	0.36	0.97
平均值	826,180	574,004	1,557,123	0.35	0.94

■ 结论

本实验使用岛津 LCMS-8045 液质联用系统，开发了调味品中去甲乌药碱含量的检测方法。实验结果表明，在 0.1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内，线性良好，相关系数 R 均 >0.999 ；0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 去甲乌药碱保留时间 RSD 为 0.1%，峰面积 RSD 为 1.4%；去甲乌药碱的检出限、定量限分别为 0.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，满足法规要求。

岛津应用云

