

LC-MS/MS 法分析尿液中乌头碱等 18 种生物碱成分

LCMSMS-701

摘要：本文利用岛津三重四极杆液质联用仪，建立乌头碱等 18 种生物碱成分的分析方法。参考标准 GA/T 1904-2021《法庭科学 生物检材中乌头碱等 21 种生物碱筛选 液相色谱 - 质谱法》考察校准曲线、仪器重复性，低点加标等参数进行测试，其结果显示，样本经乙酸乙酯溶液振荡、离心、提取上清液、吹干复溶后，以液相色谱-串联质谱法进行测定，其结果满足目标物质的定性定量要求。测试样品加标 0.5 ng/mL，均有明显检出，满足标准规定的方法检出限要求；适用于尿液中乌头碱等 18 种生物碱成分的定性定量分析，为相关从业人员分析检测提供参考。

关键词：三重四极杆液质联用仪 阳性对照样本 生物碱

乌头碱等一系列的生物碱是常见的毒性强毒物的内含成分。它们具有种类多、结构复杂和稳定性差的特点，这些毒物根据其产地、季节、炮制方法的不同，它们的主要成分也呈现较大的差异。在我国，乌头生物碱中毒的案件时有发生，其主要是因中药炮制中服用过量及误服较为常见。在这类案件的实际检验中，可选用高效液相色谱 - 光电二极管阵列检测器法及动

物实验方法进行检验。

本文使用岛津 LCMS-8060NX 三重四极杆液质联用仪建立了以甲酸铵 - 甲酸水作为流动相缓冲盐的超高效液相色谱串联质谱检验法，实现对中毒类案件中乌头碱等 18 种生物碱成分的准确、高效检验，以满足刑事案件的检验需求。同时，也可为其它生物碱毒素成分检测提供帮助。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8060NX 三重四极杆液质联用仪，具体配置为：

输液泵：LC-40B X3

系统控制器：CBM-40

自动进样器：SIL-40C X3

柱温箱：CTO-40S

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99; LabSolutions Insight Ver. 3.7

脱气机：FCV-11AL

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST-HP C18-AQ (100 mm×2.1 mm., 1.9 μm,

岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30807-02)

流动相：A 相 -5 mmol 甲酸铵 -0.1 % 甲酸水；B 相 - 乙腈

流速：0.3 mL/min

进样体积：2.0 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10 %，洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

| Time (min) | Module | Command | Value |
|------------|------------|---------|-------|
| 0.50 | Pumps | B.Conc | 10 |
| 7.00 | Pumps | B.Conc | 70 |
| 7.10 | Pumps | B.Conc | 90 |
| 9.00 | Pumps | B.Conc | 90 |
| 9.10 | Pumps | B.Conc | 10 |
| 12.00 | Controller | Stop | |

质谱条件

离子源：ESI+

加热模块温度：400°C

雾化气流速：3.0 L/min

DL 温度：250°C

加热气流速：10.0 L/min

接口温度：350°C

干燥气流速：10.0 L/min

扫描模式：MRM (+)

接口电压：1.0 kV

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

| No. | 化合物名称 | CAS | 保留时间 (min) | 前体离子 (m/z) | 产物离子 (m/z) | Q1 (V) | CE (V) | Q3 (V) |
|-----|---------|------------|------------|------------|------------|--------|--------|--------|
| 1 | 氢溴酸东莨菪碱 | 6533-68-2 | 3.384 | 304.15 | 138.10 | -22.0 | -22.0 | -26.0 |
| | | | | 304.15 | 156.10 | -22.0 | -16.0 | -30.0 |
| 2 | 氢溴酸山莨菪碱 | 55449-49-5 | 3.407 | 306.20 | 140.10 | -22.0 | -25.0 | -26.0 |
| | | | | 306.20 | 122.10 | -22.0 | -28.0 | -22.0 |
| 3 | 土的宁 | 57-24-9 | 3.820 | 335.20 | 184.15 | -24.0 | -39.0 | -20.0 |
| | | | | 335.20 | 156.10 | -24.0 | -47.0 | -28.0 |
| 4 | 马钱子碱 | 57-24-9 | 3.799 | 395.20 | 244.15 | -28.0 | -38.0 | -24.0 |
| | | | | 395.20 | 324.15 | -30.0 | -31.0 | -22.0 |
| 5 | 阿托品 | 13269-35-7 | 3.856 | 290.15 | 124.15 | -22.0 | -24.0 | -22.0 |
| | | | | 290.15 | 93.10 | -20.0 | -32.0 | -32.0 |
| 6 | 新乌头碱 | 2752-64-9 | 6.026 | 632.20 | 572.20 | -24.0 | -34.0 | -28.0 |
| | | | | 632.20 | 354.20 | -24.0 | -44.0 | -26.0 |
| 7 | 次乌头碱 | 6900-87-4 | 6.497 | 616.20 | 556.25 | -24.0 | -34.0 | -20.0 |
| | | | | 616.20 | 524.20 | -24.0 | -38.0 | -26.0 |
| 8 | 乌头碱 | 302-27-2 | 6.443 | 646.30 | 586.25 | -26.0 | -35.0 | -22.0 |
| | | | | 646.30 | 526.30 | -24.0 | -42.0 | -26.0 |
| 9 | 雪上一枝蒿甲素 | 1354-84-3 | 3.402 | 344.20 | 58.10 | -24.0 | -41.0 | -22.0 |
| | | | | 344.20 | 235.20 | -24.0 | -39.0 | -24.0 |
| 10 | 雪上一枝蒿乙素 | 466-26-2 | 3.699 | 438.20 | 420.25 | -32.0 | -31.0 | -20.0 |
| | | | | 438.20 | 388.30 | -32.0 | -33.0 | -26.0 |

| | | | | | | | | |
|----|-------|------------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|
| 11 | 青藤碱 | 115-53-7 | 3.326 | 330.20 | 239.10 | -24.0 | -27.0 | -26.0 |
| | | | | 330.20 | 181.10 | -24.0 | -35.0 | -32.0 |
| 12 | 钩吻素子 | 1358-76-5 | 3.927 | 307.25 | 180.10 | -22.0 | -47.0 | -30.0 |
| | | | | 307.25 | 167.10 | -22.0 | -51.0 | -30.0 |
| 13 | 钩吻素甲 | 509-15-9 | 3.565 | 323.20 | 70.10 | -24.0 | -33.0 | -26.0 |
| | | | | 323.20 | 236.10 | -24.0 | -28.0 | -26.0 |
| 14 | 钩吻素己 | 509-15-9 | 4.336 | 327.05 | 296.05 | -24.0 | -18.0 | -34.0 |
| | | | | 327.05 | 265.20 | -22.0 | -28.0 | -28.0 |
| 15 | 雷公藤吉碱 | 37239-47-7 | 8.308 | 858.20 | 178.15 | -34.0 | -55.0 | -32.0 |
| | | | | 858.20 | 206.00 | -34.0 | -43.0 | -22.0 |
| 16 | 蒂巴因 | 115-37-7 | 4.491 | 312.05 | 58.10 | -22.0 | -30.0 | -24.0 |
| | | | | 312.05 | 251.05 | -24.0 | -28.0 | -28.0 |
| 17 | 罂粟碱 | 59863-13-7 | 5.094 | 340.05 | 202.15 | -24.0 | -26.0 | -22.0 |
| | | | | 340.05 | 171.10 | -24.0 | -40.0 | -30.0 |
| 18 | 秋水仙碱 | 64-86-8 | 5.290 | 400.10 | 310.15 | -28.0 | -27.0 | -22.0 |
| | | | | 400.10 | 358.20 | -30.0 | -23.0 | -26.0 |

■ 样品前处理

移取尿液等液体检材样品 1.0 mL，于具盖离心管中。加入乙酸乙酯 5.0 mL，用振荡器振荡 10 min，用离心机以不低于 8000 r/min 离心 10 min，分离有机相；上清液于 40°C 吹至近干，用 300 μ L 初始流动相定容，涡旋，离心，经微孔滤膜过滤，作为检材样品提取液，供仪器检测。

■ 结果与讨论

3.1 标准品色谱图

对 1.0 ng/mL 标准溶液分析，其分析色谱图如图 1 所示，色谱图中各成分信息如表所示：

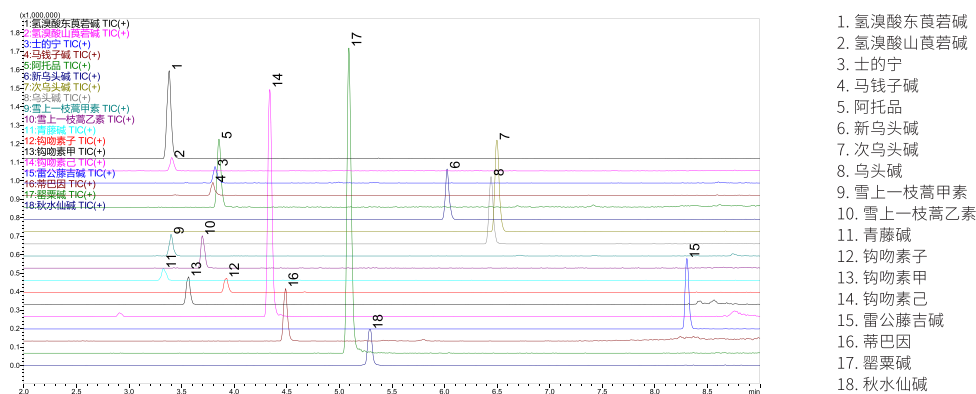


图 1 1.0 ng/mL 标准溶液色谱

3.2 校准曲线

参考标准中各目标成分最低检出限 (在 1.0~10.0 ng/mL 间)，确定校准曲线浓度为 0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL。在阴性尿液中加入适量的标准品溶液，制备成校准曲线浓度，经过前处理后，按“1.2 分析条件”进行测定。采用外标法，以待测物定量离子峰面积比为纵坐标，对应的浓度

比值为横坐标，绘制校准曲线，所得 18 种成分的校准曲线相关系数均大于 0.999。使用软件依据线性低点的信噪比自动计算定量限 ($S/N \geq 10$) 范围为 0.01 ng/mL~0.35 ng/mL，具体如表 3 所示，线性低点 MRM 色谱图如图 2 所示，线性曲线如图 3 所示。

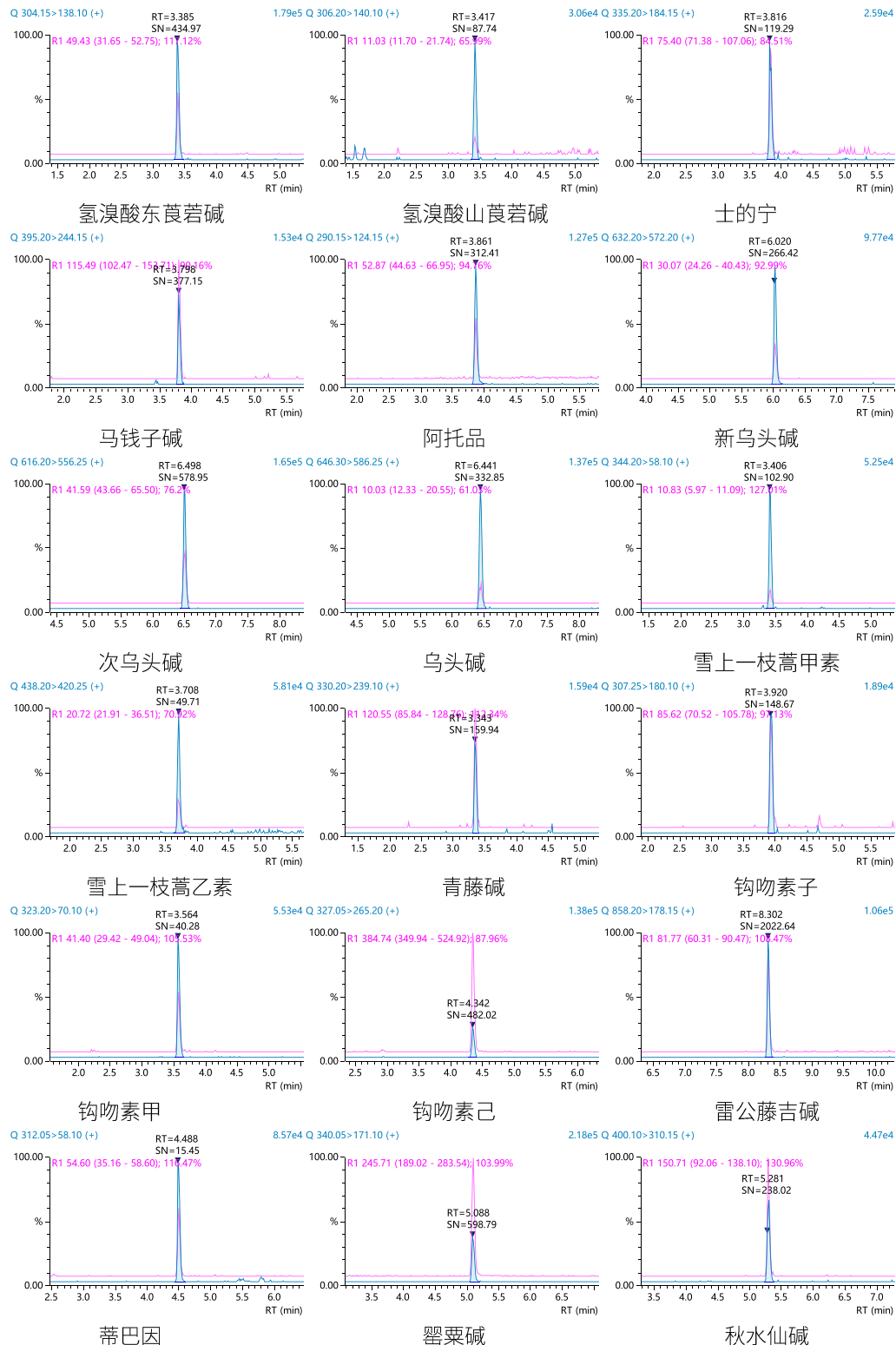


图 2 线性低点 (0.5 ng/mL) 的 MRM 色谱图

表 3 线性方程

| No. | 化合物 | 校准曲线 | 准确度 % | 相关系数 R | 定量限 (ng/mL) |
|-----|---------|-----------------------------|------------|--------|-------------|
| 1 | 氢溴酸东莨菪碱 | $Y = 90352.7X + 147572.8$ | 85.4~105.9 | 0.9999 | 0.01 |
| 2 | 氢溴酸山莨菪碱 | $Y = 165753.9X + 2635.071$ | 92.1~107.6 | 0.9991 | 0.05 |
| 3 | 土的宁 | $Y = 131346.5X + 27896.20$ | 85.3~109.7 | 0.9996 | 0.03 |
| 4 | 马钱子碱 | $Y = 77801.69X - 7282.883$ | 87.5~106.5 | 0.9997 | 0.04 |
| 5 | 阿托品 | $Y = 683432.2X - 149924.5$ | 95.2~114.5 | 0.9996 | 0.02 |
| 6 | 新乌头碱 | $Y = 530517.7X + 35494.66$ | 94.3~104.2 | 0.9999 | 0.01 |
| 7 | 次乌头碱 | $Y = 839610.5X + 246425.0$ | 94.3~108.6 | 0.9997 | 0.01 |
| 8 | 乌头碱 | $Y = 772455.5X + 234119.7$ | 86.3~106.7 | 0.9998 | 0.01 |
| 9 | 雪上一枝蒿甲素 | $Y = 271536.5X - 633.4570$ | 95.8~106.2 | 0.9997 | 0.05 |
| 10 | 雪上一枝蒿乙素 | $Y = 298036.7X + 41253.87$ | 94.9~105.9 | 0.9996 | 0.07 |
| 11 | 青藤碱 | $Y = 80763.89X + 17112.02$ | 85.8~112.0 | 0.9995 | 0.02 |
| 12 | 钩吻素子 | $Y = 125645.0X - 1721.721$ | 86.2~105.1 | 0.9997 | 0.03 |
| 13 | 钩吻素甲 | $Y = 279898.6X + 34538.64$ | 85.0~109.5 | 0.9996 | 0.17 |
| 14 | 钩吻素己 | $Y = 691233.4X - 101618.7$ | 93.9~114.2 | 0.9994 | 0.02 |
| 15 | 雷公藤吉碱 | $Y = 504659.0X - 2040.855$ | 94.7~106.6 | 0.9997 | 0.01 |
| 16 | 蒂巴因 | $Y = 461403.4X - 39249.80$ | 95.6~114.4 | 0.9997 | 0.35 |
| 17 | 罂粟碱 | $Y = 1152236.0X + 268363.2$ | 87.2~102.2 | 0.9999 | 0.01 |
| 18 | 秋水仙碱 | $Y = 249111.7X + 5235.510$ | 92.7~107.4 | 0.9992 | 0.02 |

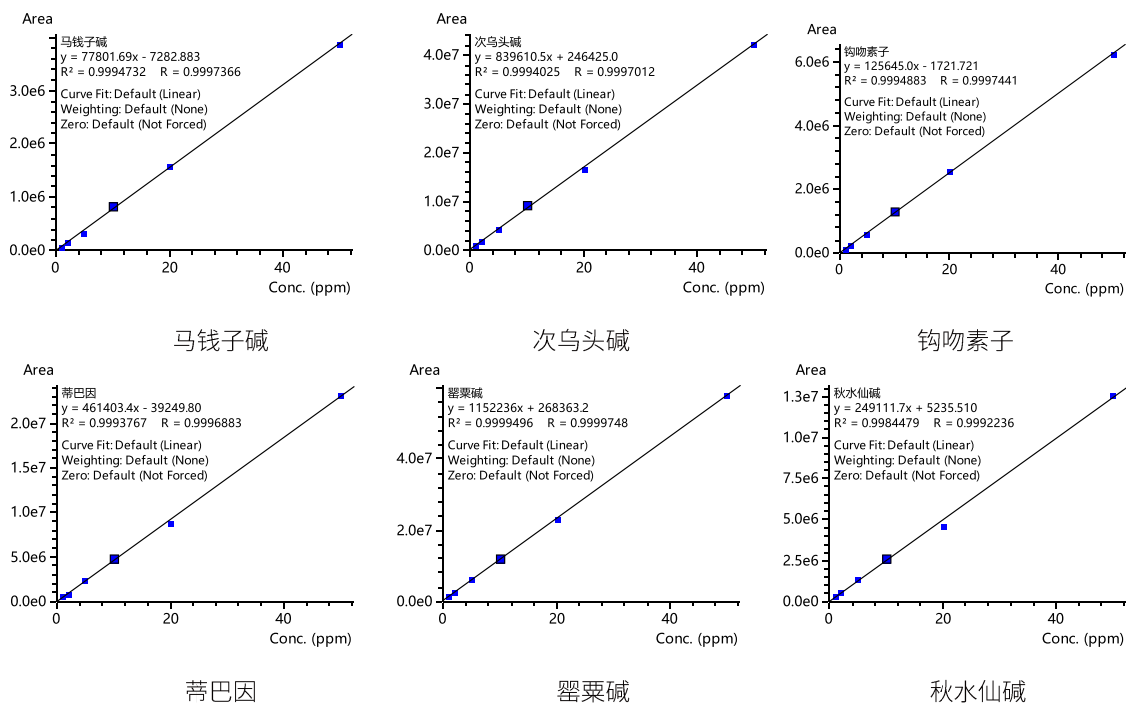


图 3 六种成分阳性对照样本线性方程图

3.3 重复性结果

在阴性尿液中加入适量标准溶液，制备成 2 ng/mL、10 ng/mL 的加标样本，经前处理后，进行平行六次检测，结果显示：保留时间的 RSD% 在 0.02~0.21%，峰面积的 RSD% 在 0.37~1.97%；重复性良好。具体结果如表 4 所示。

表 4 2 ng/mL、10 ng/mL 加标样本重复性结果 (n=6)

| No. | 化合物 | 2 ng/mL 保留时间 RSD% | 2 ng/mL 峰面积 RSD% | 10 ng/mL 保留时间 RSD% | 10 ng/mL 峰面积 RSD% |
|-----|---------|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| 1 | 氢溴酸东莨菪碱 | 0.17 | 0.37 | 0.13 | 1.81 |
| 2 | 氢溴酸山莨菪碱 | 0.18 | 0.87 | 0.18 | 1.57 |
| 3 | 土的宁 | 0.16 | 0.73 | 0.08 | 1.96 |
| 4 | 马钱子碱 | 0.07 | 1.66 | 0.11 | 0.89 |
| 5 | 阿托品 | 0.10 | 1.25 | 0.02 | 1.46 |
| 6 | 新乌头碱 | 0.07 | 1.67 | 0.05 | 1.50 |
| 7 | 次乌头碱 | 0.02 | 1.32 | 0.06 | 1.72 |
| 8 | 乌头碱 | 0.07 | 1.51 | 0.06 | 1.14 |
| 9 | 雪上一枝蒿甲素 | 0.16 | 1.74 | 0.13 | 1.72 |
| 10 | 雪上一枝蒿乙素 | 0.09 | 1.71 | 0.14 | 1.97 |
| 11 | 青藤碱 | 0.17 | 1.96 | 0.21 | 1.25 |
| 12 | 钩吻素子 | 0.12 | 1.65 | 0.10 | 1.70 |
| 13 | 钩吻素甲 | 0.19 | 1.68 | 0.15 | 0.60 |
| 14 | 钩吻素己 | 0.08 | 1.65 | 0.06 | 1.37 |
| 15 | 雷公藤吉碱 | 0.05 | 1.84 | 0.03 | 1.74 |
| 16 | 蒂巴因 | 0.11 | 1.63 | 0.10 | 1.83 |
| 17 | 罂粟碱 | 0.11 | 1.72 | 0.07 | 1.76 |
| 18 | 秋水仙碱 | 0.07 | 1.00 | 0.05 | 1.89 |

3.4 考察仪器残留

进样顺序：先进样 1.0 μg/mL 的标准溶液，再进样阴性空白。结果显示：阴性空白未检出目标物成分，仪器无残留。1 μg/mL 标准溶液和阴性空白色谱图如图 4 所示。

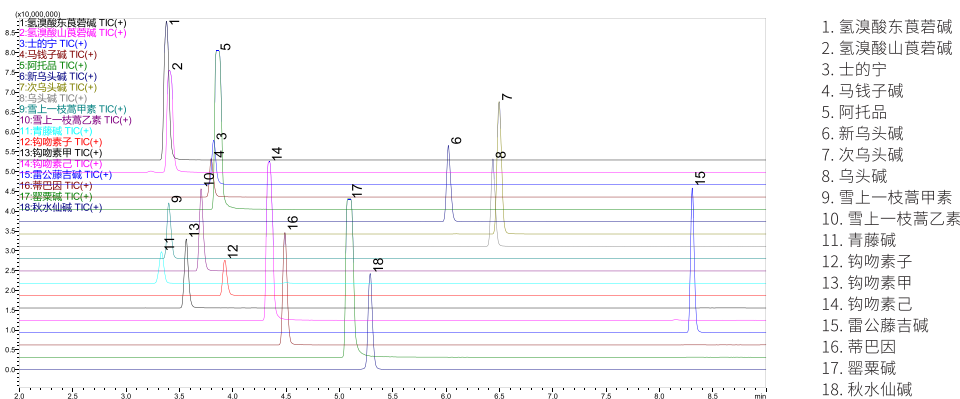


图 4 1 μg/mL 标准溶液色谱图

3.5 加标样本检测结果

在阴性尿液中加入适量标准溶液，平行制备 2 份浓度为 2 ng/mL 的加标样本，经前处理后，进行检测。其结果显示，回收率在 87.9%~104.3% 之间，加标样本检测结果如表 5 所示。

表 5 加标样本检测结果

| No. | 化合物 | 检测结果平均值 (ng/mL) | 回收率 (%) |
|-----|---------|--------------------|------------|
| 1 | 氢溴酸东莨菪碱 | 1.924 | 96.2 |
| 2 | 氢溴酸山莨菪碱 | 1.980 | 99.0 |
| 3 | 土的宁 | 0.08 | 87.9 |
| 4 | 马钱子碱 | 0.11 | 104.2 |
| 5 | 阿托品 | 0.02 | 104.1 |
| 6 | 新乌头碱 | 0.05 | 98.5 |
| 7 | 次乌头碱 | 0.06 | 93.4 |
| 8 | 乌头碱 | 0.06 | 96.7 |
| 9 | 雪上一枝蒿甲素 | 0.13 | 101.1 |
| 10 | 雪上一枝蒿乙素 | 0.14 | 96.8 |
| 11 | 青藤碱 | 0.21 | 94.0 |
| 12 | 钩吻素子 | 0.10 | 97.8 |
| 13 | 钩吻素甲 | 0.15 | 102.7 |
| 14 | 钩吻素己 | 0.06 | 104.3 |
| 15 | 雷公藤吉碱 | 0.03 | 98.4 |
| 16 | 蒂巴因 | 0.10 | 98.0 |
| 17 | 罂粟碱 | 0.07 | 98.1 |
| 18 | 秋水仙碱 | 0.05 | 102.6 |

■ 结论

本文利用岛津公司 LCMS-8060NX 三重四极杆液质联用仪对乌头碱等 18 种生物碱成分建立检验方法。结果显示：保留时间和峰面积的重复性结果分别在 0.02%~0.21% 和 0.37%~1.97% 范围内；以阴性尿液为基质，加标后制备成基质校准曲线，其线性表现良好，校准曲线相关系数均大于 0.999。用高浓度标准溶液考察仪器残留问题，结果显示不存在交叉污染，无残留，仪器适用性强。本方法可满足标准 GA/T 1904-2021《法庭科学 生物检材中乌头碱等 21 种生物碱筛选 液相色谱 - 质谱法》中涉及的 18 种生物碱成分的最低检出限要求，可用于乌头碱等 18 种生物碱成分的检测，为相关化合物检测提供参考。

岛津应用云

