

LC-MS/MS 快速筛查中药酒剂中 24 种毒性成分

LCMSMS-902

摘要： 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了中药酒剂中 24 种毒性成分快速检验方法。结果表明，在线性范围内，线性相关系数 $r > 0.99$ ，线性良好。3 个加标水平下的平均回收率为 79.6%~107.0%，相对标准偏差 RSD% 为 5.3%~17.0%。该方法前处理简便，高效，灵敏度高，选择性好，适用于中药酒剂中毒性成分的检测及安全性评价。

关键词： 毒性成分 药酒 生物碱 三重四极杆液质联用仪

技术特点：

- ❖ 14 min 内完成 24 种毒性成分同时检测，实现快速应对中药急性中毒应急检验工作。
- ❖ 前处理添加 0.5% 氨水甲醇，利于生物碱游离，同时提高了供试品溶液的有机相比例，有利于消除色谱峰的溶剂效应。

生物碱为生物体中一大类含氮的有机碱性化合物，药理活性作用广泛，在毒性中药中往往表现出急性或慢性的毒理作用。根据文献报道及实际检验工作，常见的易引起急性毒性的生物碱包括乌头类、钩吻类、番木鳖类、莨菪类、雷公藤类等。民间泡酒常用药材中往往含有上述几类生物碱，普通民众对这些植物的毒性的认识有限，或使用方式不当，或不明掺伪，频频导致中毒事件发生。

使用三重四极杆液质联用仪，能够同时检测多种不同理化性质目标物，目前在痕量分析领域使用十分广泛。因此，本文采用超高效液相色谱 - 串联质谱法建立了中药酒剂中涵盖 7 类中药共计 24 种毒性成分的快速筛查检测方法，实现了快速应对中药急性中毒的应急检验工作，为药品的监督执法、医院对症抢救患者提供依据。

■ 实验部分

1.1 仪器

本文使用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪，具体配置为：

| | | | |
|--------|-------------------------|--------|-----------------------|
| 系统控制器： | CBM-40 | 脱气机： | DGU-20A _{5R} |
| 输液泵： | LC-30AD × 2 | 自动进样器： | SIL-30AC |
| 柱温箱： | CTO-20AC | 质谱检测器： | LCMS-8050 |
| 色谱工作站： | LabSolutions Ver. 5.123 | | |

1.2 分析条件

液相条件

| | | | |
|-------|--|------|------|
| 色谱柱： | Shim-pack GLSS C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30048-02) | | |
| 流动相： | A 相 - 5 mmol/L 乙酸铵水溶液; B 相 - 乙腈 | | |
| 流速： | 0.3 mL/min | 进样量： | 2 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 梯度洗脱程序

| 时间 (min) | 单元 | 处理命令 | 值 |
|----------|-----|--------|----|
| 1.00 | 泵 | B.Conc | 10 |
| 7.00 | 泵 | B.Conc | 90 |
| 9.00 | 泵 | B.Conc | 90 |
| 9.50 | 泵 | B.Conc | 10 |
| 14.00 | 控制器 | Stop | |

质谱条件

| | | | |
|---------|------------|---------|-------------|
| 离子源 : | ESI (+) | 加热块温度 : | 400°C |
| 雾化气流速 : | 1.5 L/min | DL 温度 : | 200°C |
| 加热气流速 : | 10.0 L/min | 接口温度 : | 300°C |
| 干燥气流速 : | 10.0 L/min | 扫描模式 : | 多反应监测 (MRM) |

表 2 化合物信息及 MRM 优化参数

| No. | 化合物名称 | CAS | 前体离子 | 产物离子 | Q1 Pre Bias (V) | CE (V) | Q3 Pre Bias (V) |
|-----|------------|------------|--------|---------|-----------------|--------|-----------------|
| 1 | 东莨菪碱 | 51-34-3 | 304.05 | 138.20* | -17 | -24 | -24 |
| | | | | 156.10 | -10 | -16 | -27 |
| 2 | 山莨菪碱 | 55869-99-3 | 306.00 | 140.10* | -17 | -25 | -24 |
| | | | | 122.30 | -16 | -28 | -22 |
| 3 | 莨菪碱 / 天仙子胺 | 101-31-5 | 290.00 | 124.05* | -16 | -26 | -20 |
| | | | | 93.15 | -16 | -31 | -16 |
| 4 | 樟柳碱 | 52646-92-1 | 319.95 | 156.10* | -17 | -22 | -15 |
| | | | | 138.30 | -17 | -23 | -25 |
| 5 | 青藤碱 | 115-53-7 | 330.00 | 239.00* | -18 | -29 | -24 |
| | | | | 181.10 | -18 | -35 | -30 |
| 6 | 雷公藤甲素 | 38748-32-2 | 361.20 | 156.20* | -27 | -35 | -16 |
| | | | | 320.20 | -10 | -13 | -16 |
| 7 | 雷公藤吉碱 | 37239-47-7 | 858.20 | 178.25* | -22 | -54 | -18 |
| | | | | 206.10 | -22 | -45 | -19 |
| 8 | 雷公藤红素 | 34157-83-0 | 451.10 | 201.10* | -19 | -27 | -21 |
| | | | | 215.30 | -12 | -21 | -15 |
| 9 | 士的宁 / 番木鳖碱 | 57-24-9 | 335.00 | 184.05* | -18 | -40 | -19 |
| | | | | 156.00 | -18 | -48 | -27 |
| 10 | 马钱子碱 | 357-57-3 | 395.00 | 324.05* | -12 | -32 | -22 |
| | | | | 244.15 | -21 | -38 | -26 |

| | | | | | | | |
|----|---------|------------|--------|---------|-----|-----|-----|
| 11 | 番木鳖次碱 | 125-15-5 | 381.25 | 236.20* | -15 | -47 | -26 |
| | | | | 160.20 | -27 | -42 | -28 |
| 12 | 钩吻素子 | 1358-76-5 | 307.05 | 204.00* | -10 | -52 | -13 |
| | | | | 180.10 | -17 | -44 | -30 |
| 13 | 钩吻碱 | 509-15-9 | 323.30 | 70.20* | -13 | -33 | -27 |
| | | | | 236.30 | -24 | -28 | -27 |
| 14 | 胡蔓藤碱甲 | 82354-38-9 | 327.05 | 296.05* | -11 | -20 | -20 |
| | | | | 265.10 | -18 | -30 | -27 |
| 15 | 常绿钩吻碱 | 6882-99-1 | 353.50 | 322.05* | -10 | -19 | -11 |
| | | | | 291.10 | -11 | -26 | -13 |
| 16 | 乌头碱 | 302-27-2 | 646.10 | 586.25* | -26 | -36 | -28 |
| | | | | 105.05 | -20 | -55 | -18 |
| 17 | 新乌头碱 | 2752-64-9 | 632.20 | 105.10* | -20 | -55 | -18 |
| | | | | 572.20 | -26 | -36 | -28 |
| 18 | 次乌头碱 | 6900-87-4 | 616.40 | 556.35* | -15 | -35 | -15 |
| | | | | 524.30 | -15 | -39 | -15 |
| 19 | 雪上一枝蒿甲素 | 1354-84-3 | 344.10 | 235.10* | -18 | -38 | -24 |
| | | | | 58.00 | -19 | -39 | -22 |
| 20 | 雪上一枝蒿乙素 | 466-26-2 | 438.10 | 388.20* | -23 | -34 | -26 |
| | | | | 420.25 | -23 | -32 | -29 |
| 21 | 马兜铃酸 A | 313-67-7 | 359.05 | 296.10* | -25 | -21 | -22 |
| | | | | 298.00 | -23 | -21 | -29 |
| 22 | 马兜铃内酰胺 | 13395-02-3 | 294.05 | 279.00* | -20 | -26 | -29 |
| | | | | 251.05 | -11 | -36 | -16 |
| 23 | 秋水仙碱 | 64-86-8 | 400.00 | 358.20* | -22 | -25 | -17 |
| | | | | 310.10 | -21 | -27 | -22 |
| 24 | 藜芦胺 | 60-70-8 | 410.15 | 84.00* | -22 | -30 | -15 |
| | | | | 392.25 | -22 | -27 | -27 |

注：* 表示定量离子

1.3 混合标准溶液的配制

分别准确称取表 2 中的 24 种毒性成分对照品各适量于 20 mL 量瓶，用 50% 甲醇溶解，配制成 100 mg/L 的单标储备液（-30℃暗处保存）。精密吸取各单标储备液适量，用甲醇制备成各含 500 ng/mL 的混合标准品溶液。

1.4 供试品溶液的制备

取供试品适量，离心 5 min，精密量取上清液 1 mL，加 0.5% 氨水甲醇 1 mL，混匀，用微孔滤膜（0.22 μm）滤过，即得。

■ 结果与讨论

2.1 化合物 TIC 图

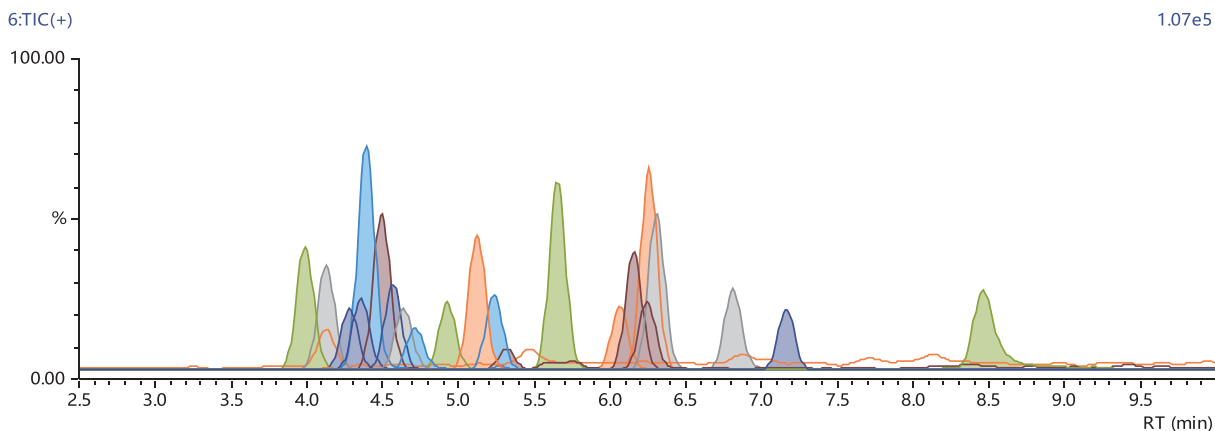


图 1 24 种毒性成分基质混合对照品溶液 TIC 图 (100 ng/mL)

2.2 基质效应

采用相对法考察基质效应，分别配制溶剂标准溶液与基质匹配的标准溶液，建立相应的标准曲线并计算回归方程，通过斜率比值进行判断。计算公式如下：基质效应 = 基质匹配的标准曲线斜率 / 溶剂标准曲线斜率 × 100%。计算结果在 85%~115% 之间，显示基质效应在可控范围；计算结果小于 85%，显示有基质抑制效应；计算结果大于 115%，显示有基质增强效应，具体结果见表 3。结果表明，24 种毒性成分中，部分化合物具有基质增强效应和基质抑制效应。为了抵消基质效应对定量结果的差异影响，采用基质匹配的混合对照品溶液建立标准曲线。

表 3 24 种毒性成分基质效应

| No. | 化合物名称 | 基质效应 (%) | No. | 化合物名称 | 基质效应 (%) |
|-----|------------|----------|-----|---------|----------|
| 1 | 东莨菪碱 | 95.1 | 13 | 钩吻碱 | 78.6 |
| 2 | 山莨菪碱 | 110.0 | 14 | 胡蔓藤碱甲 | 108.0 |
| 3 | 莨菪碱 / 天仙子胺 | 112.0 | 15 | 常绿钩吻碱 | 95.9 |
| 4 | 樟柳碱 | 103.0 | 16 | 乌头碱 | 106.0 |
| 5 | 青藤碱 | 99.8 | 17 | 新乌头碱 | 88.7 |
| 6 | 雷公藤甲素 | 120.0 | 18 | 次乌头碱 | 99.8 |
| 7 | 雷公藤吉碱 | 96.7 | 19 | 雪上一枝蒿甲素 | 95.0 |
| 8 | 雷公藤红素 | 123.0 | 20 | 雪上一枝蒿乙素 | 99.4 |
| 9 | 土的宁 / 番木鳖碱 | 80.7 | 21 | 马兜铃酸 A | 88.6 |
| 10 | 马钱子碱 | 88.9 | 22 | 马兜铃内酰胺 | 95.4 |
| 11 | 番木鳖次碱 | 56.1 | 23 | 秋水仙碱 | 65.5 |
| 12 | 钩吻素子 | 94.6 | 24 | 藜芦胺 | 96.5 |

2.3 线性，检测限及定量限

分别取 1.4 制备得到的空白基质溶液各 8 份，每份 0.5 mL，分别精密吸取混合标准品溶液 2、5、10、20、50、100、200、300 μ L，加 0.5% 氨水甲醇补充至 1 mL，得到基质匹配的系列浓度混合对照品溶液，上机测试。以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析。结果表明，24 种毒性成分线性范围内相关系数大于 0.99，线性良好。

表 4 24 种毒性成分校准曲线参数

| No. | 化合物名称 | 线性范围 (ng/mL) | 相关系数 (r) | 准确度 (%) | 检测限 (ng/mL) | 检测限 (ng/mL) |
|-----|------------|--------------|----------|------------|-------------|-------------|
| 1 | 东莨菪碱 | 0.9-128.6 | 0.9946 | 88.7-114.6 | 0.3 | 1.7 |
| 2 | 山莨菪碱 | 1.1-170.0 | 0.9960 | 93.3-117.8 | 0.5 | 2.3 |
| 3 | 莨菪碱 / 天仙子胺 | 1.1-158.1 | 0.9984 | 94.9-116.0 | 0.4 | 2.1 |
| 4 | 樟柳碱 | 1.3-188.5 | 0.9921 | 93.5-115.2 | 0.5 | 2.5 |
| 5 | 青藤碱 | 0.9-140.0 | 0.9935 | 85.7-116.9 | 0.4 | 1.9 |
| 6 | 雷公藤甲素 | 1.2-174.6 | 0.9977 | 83.6-118.3 | 0.5 | 2.3 |
| 7 | 雷公藤吉碱 | 1.1-161.4 | 0.9997 | 90.6-105.6 | 0.4 | 2.2 |
| 8 | 雷公藤红素 | 1.2-175.0 | 0.9992 | 92.0-111.2 | 0.5 | 2.3 |
| 9 | 土的宁 / 番木鳖碱 | 1.1-160.2 | 0.9994 | 95.8-115.3 | 0.5 | 2.1 |
| 10 | 马钱子碱 | 1.0-156.0 | 0.9973 | 92.8-113.6 | 1.0 | 2.1 |
| 11 | 番木鳖次碱 | 1.1-158.9 | 0.9973 | 93.8-112.0 | 1.1 | 2.1 |
| 12 | 钩吻素子 | 1.1-158.8 | 0.9924 | 85.1-115.6 | 0.4 | 2.1 |
| 13 | 钩吻碱 | 1.0-153.0 | 0.9991 | 95.9-115.4 | 0.4 | 2.0 |
| 14 | 胡蔓藤碱甲 | 1.0-146.0 | 0.9993 | 95.6-115.5 | 0.2 | 1.9 |
| 15 | 常绿钩吻碱 | 1.0-157.5 | 0.9911 | 86.4-119.3 | 0.2 | 2.1 |
| 16 | 乌头碱 | 1.1-158.7 | 0.9990 | 95.4-117.9 | 0.2 | 2.1 |
| 17 | 新乌头碱 | 1.1-158.5 | 0.9990 | 92.2-117.2 | 0.2 | 2.1 |
| 18 | 次乌头碱 | 1.0-144.1 | 0.9951 | 90.2-117.9 | 0.2 | 1.9 |
| 19 | 雪上一枝蒿甲素 | 1.2-176.3 | 0.9917 | 91.2-118.4 | 0.6 | 2.4 |
| 20 | 雪上一枝蒿乙素 | 1.0-155.0 | 0.9987 | 83.9-109.8 | 0.4 | 2.1 |
| 21 | 马兜铃酸 A | 1.1-163.0 | 0.9990 | 97.4-116.3 | 1.1 | 2.2 |
| 22 | 马兜铃内酰胺 | 1.1-163.9 | 0.9987 | 90.3-118.4 | 0.4 | 2.2 |
| 23 | 秋水仙碱 | 1.0-145.6 | 0.9942 | 87.4-116.7 | 1.0 | 1.9 |
| 24 | 藜芦胺 | 1.1-159.1 | 0.9986 | 85.3-116.9 | 0.4 | 2.1 |

2.4 加标回收率试验

取未检出毒性成分的样品作为空白基质，加入 3 个加标水平 (5、25、100 ng/mL)，按照 1.4 前处理方式进行处理，平行测定 2 次，进行加标回收率试验。结果表明，24 种毒性成分的平均回收率为 79.6%~107.0%，相对标准偏差 RSD% 为 5.3%~17.0%，具体结果见表 5。

表5 加标回收率结果 (n=2)

| No. | 化合物名称 | 回收率 (%) | RSD (%) | No. | 化合物名称 | 回收率 (%) | RSD (%) |
|-----|------------|---------|---------|-----|---------|---------|---------|
| 1 | 东莨菪碱 | 96.6 | 7.8 | 13 | 钩吻碱 | 97.3 | 6.4 |
| 2 | 山莨菪碱 | 95.1 | 5.3 | 14 | 胡蔓藤碱甲 | 96.8 | 7.3 |
| 3 | 莨菪碱 / 天仙子胺 | 95.8 | 5.1 | 15 | 常绿钩吻碱 | 99.9 | 8.6 |
| 4 | 樟柳碱 | 96.4 | 7.7 | 16 | 乌头碱 | 92.4 | 6.9 |
| 5 | 青藤碱 | 107.0 | 12.0 | 17 | 新乌头碱 | 96.1 | 6.4 |
| 6 | 雷公藤甲素 | 97.6 | 16.0 | 18 | 次乌头碱 | 99.8 | 9.0 |
| 7 | 雷公藤吉碱 | 79.6 | 7.5 | 19 | 雪上一枝蒿甲素 | 99.9 | 12.0 |
| 8 | 雷公藤红素 | 101.0 | 14.0 | 20 | 雪上一枝蒿乙素 | 96.7 | 6.1 |
| 9 | 士的宁 / 番木鳖碱 | 96.1 | 8.5 | 21 | 马兜铃酸 A | 97.3 | 17.0 |
| 10 | 马钱子碱 | 96.3 | 5.3 | 22 | 马兜铃内酰胺 | 94.9 | 14.0 |
| 11 | 番木鳖次碱 | 86.8 | 12.0 | 23 | 秋水仙碱 | 91.2 | 10.0 |
| 12 | 钩吻素子 | 96.3 | 8.7 | 24 | 藜芦胺 | 97.9 | 5.4 |

2.5 样品测定

取4批中药酒剂(含酞剂)按照1.4前处理方式进行处理,1.2分析条件上机分析,样品TIC图见图2,结果见表6。结果表明,样品1、2为药店购买的具有国药准字号的药酒,毒性成分检出情况与处方中药材基本一致;样品3、4为农贸市场购买的自制药酒,均检出毒性成分,提示自制药酒有滥用毒性药材的现象。

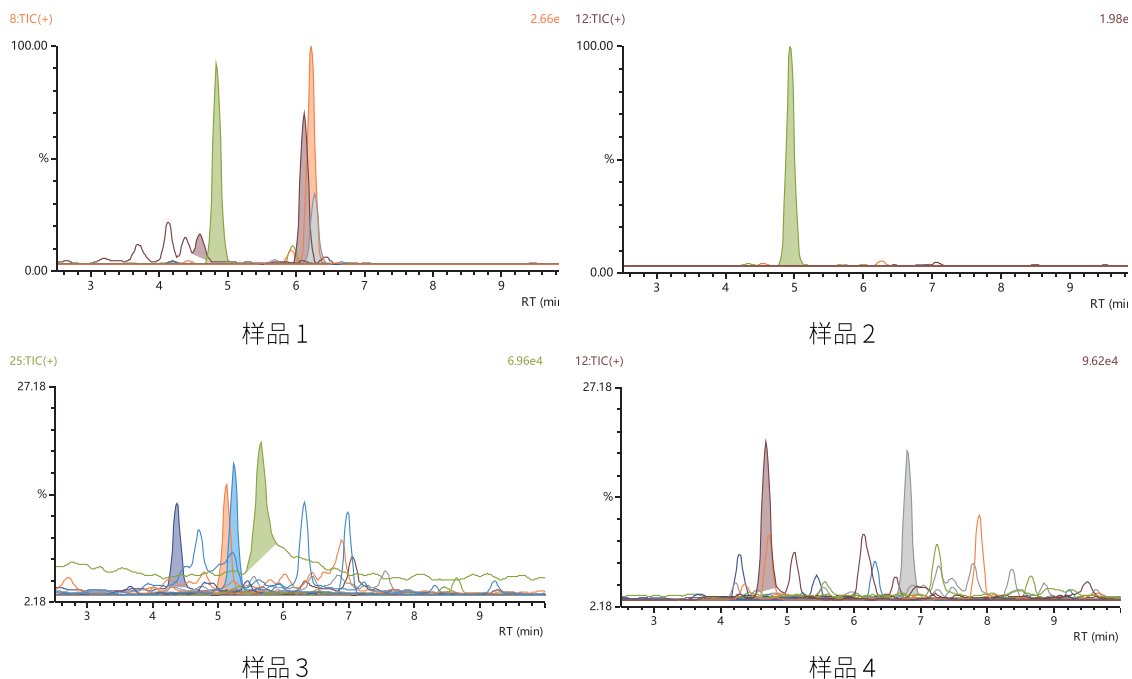


图2 样品TIC图

表 6 样品检出情况

| 名称 | 含毒性药材 | 检出毒性成分 (ng/mL) | |
|------|--------|----------------|-------|
| 样品 1 | 草乌, 川乌 | 青藤碱 | 6.1 |
| | | 乌头碱 | 199.5 |
| | | 新乌头碱 | 445.2 |
| | | 次乌头碱 | 521.1 |
| | | 雪上一支蒿乙素 | 937.8 |
| 样品 2 | 附子 | 雪上一支蒿乙素 | 464.8 |
| 样品 3 | 未有说明 | 钩吻素子 | 27.8 |
| | | 钩吻碱 | 9.8 |
| | | 胡曼藤碱甲 | 13.7 |
| | | 常绿钩吻碱 | 14.8 |
| 样品 4 | 未有说明 | 青藤碱 | 265.6 |
| | | 马兜铃内酰胺 | 72.6 |

■ 结论

本文建立了针对中药酒剂中 24 种毒性生物碱的快速筛查检测方法, 该方法简单、快速, 稳定性强, 适用于中药酒剂中毒性成分的检测及安全性评价, 能满足食品安全突发事件的应急检测要求。

岛津应用云

