

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240312002

盐析辅助液液萃取-超高效液相色谱-串联质谱法 快速测定糕点中 14 种生物碱

黄莹偲*, 郑倩清, 刘国平, 卢丽明

(中山市疾病预防控制中心, 中山 528400)

摘要: 目的 建立一种应用盐析辅助液液萃取前处理技术结合超高效液相色谱-串联质谱法快速测定糕点中 14 种常见有毒生物碱的分析方法。**方法** 样品加水超声处理后, 在碱性条件下(pH=11), 用乙腈提取, 加入氯化钠盐析分层。取乙腈相氮吹至干后用 40% 甲醇水溶液复溶, 使用 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲酸铵的水溶液和乙腈为流动相, 在 C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.5 μm)上通过梯度洗脱实现目标物分离, 在串联质谱正离子多反应监测模式下进行检测, 溶剂标准曲线外标法定量。**结果** 14 种生物碱在 0.5~100.0 ng/mL 的范围内具有良好的线性关系, 相关系数均≥0.999, 检出限和定量限范围分别为 0.1~2.2 μg/kg 和 0.3~7.1 μg/kg。在 8.00、50.00 和 200.00 μg/kg 的加标浓度下, 14 种生物碱的平均回收率为 76.3%~105.7%, 相对标准偏差为 1.2%~9.8% (n=6)。**结论** 本方法简单、快速、准确, 能满足糕点中 14 种生物碱的快速筛查和定量分析, 可用于疑似生物碱中毒的应急事件处理。

关键词: 盐析辅助液液萃取; 超高效液相色谱-串联质谱法; 生物碱; 糕点

Rapid determination of 14 kinds of alkaloids in pastries by salting-out assisted liquid-liquid extraction with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HUANG Ying-Si*, ZHENG Qian-Qing, LIU Guo-Ping, LU Li-Ming

(Zhongshan Center for Disease Control and Prevention, Zhongshan 528400, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the rapid determination of 14 kinds of common toxic alkaloids in pastries using salting-out assisted liquid-liquid extraction pretreatment combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were ultrasonicated with water, extracted with acetonitrile under alkaline conditions (pH=11) and separated by adding sodium chloride for salting-out. The acetonitrile phase was dried by nitrogen blowing and then redissolved with 40% methanol aqueous solution. The separation of the targets was achieved by gradient elution on C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 2.5 μm) using 0.1% formic acid-5 mmol/L ammonium formate aqueous solution and acetonitrile as the mobile phases, and the targets were detected by tandem mass spectrometry positive ion multiple reaction monitoring mode, and quantified by

基金项目: 中山市医学科研项目(2021J300)

Fund: Supported by the Medical Research Program of Zhongshan (2021J300)

*通信作者: 黄莹偲, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品安全检测方向。E-mail: huangys1104@163.com

*Corresponding author: HUANG Ying-Si, Master, Technician, Zhongshan Center for Disease Control and Prevention, No.70, Changjiang Road, East District, Zhongshan 528400, China. E-mail: huangys1104@163.com

external standard method with solvent standard curve. **Results** The 14 kinds of alkaloids showed good linearity in the range of 0.5–100.0 ng/mL with the correlation coefficients greater than or equal to 0.999. The ranges for limits of detection and the limits of quantitation were 0.1–2.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.3–7.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average recoveries for the 14 kinds of alkaloids at spiked concentrations of 8.00, 50.00 and 200.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ range from 76.3%–105.7% with the relative standard deviations of 1.2%–9.8% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, quick and accurate, which can meet the requirements of rapid screening and quantitative analysis of 14 kinds of alkaloids in pastries, and can be used for emergency incident management of suspected alkaloid poisoning.

KEY WORDS: salting-out assisted liquid-liquid extraction; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; alkaloids; pastries

0 引言

生物碱广泛存在于植物体内,大部分具有显著的生物活性,是许多药用植物的有效成分^[1]。但大部分生物碱药效与毒性并存,使用不当会对心脏、肝肾、细胞等产生毒副作用^[2–6]。部分生物碱摄入极微量即可引发中毒,如颠茄科植物中的莨菪碱、钩吻属植物中的钩吻碱、马钱子科植物中的番木鳖碱、百合科植物中的秋水仙碱,其中毒剂量为 5 mg 左右,毛茛科植物中的乌头碱中毒剂量则仅为 0.12 mg^[4]。生物碱中毒的常见症状有头晕头痛、恶心呕吐、腹痛腹泻、呼吸困难等表现,严重时则会造成死亡^[2]。除上述症状外,个别生物碱还有特定的毒性表现,如秋水仙碱能产生代谢类毒性,对肝肾功能造成损伤^[3]。含有毒生物碱的植物科属繁多,分布广泛,且外观与常见的植物或草药极为相似,如含有钩吻碱的断肠草,其根茎、花的形状与五指毛桃、金银花等常见药材十分相似;含有颠茄碱类生物碱的曼陀罗,其种子、花和叶片的形态与黑芝麻、喇叭花和一些可食用野菜相似,一般人难以辨认,导致因误采、误食而引起中毒的案件时有发生^[7–10]。广东一带的居民,历来有使用各类中草药或植物制作栳樨饼、艾草饼、土茯苓糕等传统养生糕点的习惯,该类糕点易混入有毒生物碱成分,存在较大的食品安全隐患,因此十分有必要建立糕点中多种生物碱同时测定的分析方法。

生物碱检测的样品前处理方法有固相萃取^[11]、液液萃取^[12]、分散固相萃取^[13]、盐析辅助液液萃取^[14]等。其中,盐析辅助液液萃取是一种可操作性强、简便快捷且效率高的前处理方法,其原理是利用有机提取溶剂与试样水溶液形成混合体系,再通过添加适当的盐析剂使有机提取溶剂和试样溶液分层,从而实现目标物的分离提取^[15]。目前该前处理方法有被用于蜂蜜^[14]、烟草产品^[16]、血浆^[17]等基质中生物碱的分析检测。近年来,液相色谱-质谱法因同时具备色谱的高分离能力和质谱的高选择性,抗干扰能力强、灵敏度和准确度高,已被广泛应用于生物材料^[18–19]、药酒^[20–21]、药材^[22–23]、蜂蜜^[24–25]、蔬果^[26–27]、

火锅底料^[28–29]等复杂基质中生物碱的检测。目前国内外针对糕点中多种生物碱同时检测的方法报道较少,本研究拟采用盐析辅助液液萃取的前处理技术,结合超高效液相色谱-串联质谱法,建立糕点中 14 种常见有毒生物碱的快速分析方法,旨在为含草药或植物成分糕点中生物碱的监测以及生物碱相关的中毒事件的定性定量检测,提供参考方法和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

糕点:市售栳樨饼、艾草饼、土茯苓糕、芝麻糕各 2 份;食物中毒送检样品:患者自制草药糍粑 2 份。

14 种生物碱标准品: α -茄碱(纯度 95.0%)、 α -卡茄碱(纯度 95.0%)、乌头碱(纯度 96.0%)、次乌头碱(纯度 96.0%)、新乌头碱(纯度 96.0%)(加拿大 TRC 公司);钩吻素己(纯度 99.1%)、钩吻素子(纯度 99.4%)(上海诗丹德公司);东莨菪碱(纯度 98.7%,广州 CATO 公司);莨菪碱(纯度 97.6%,美国 ChromaDex 公司);钩吻素甲(纯度 99.04%)、番木鳖碱(纯度 99.21%)、马钱子碱(纯度 99.83%)(成都曼思特公司);毒扁豆碱(纯度 96.3%)、秋水仙碱(纯度 93.8%)(德国 DR 公司);乙腈、甲醇(色谱纯,美国 FISHER 公司);甲酸铵(色谱纯,美国 TEDIA 公司);甲酸(色谱纯,美国 CNW 公司);氨水(优级纯,美国 CNW 公司);氢氧化钠、氯化钠(优级纯,广州化学试剂厂)。

1.2 仪器与设备

Triple Quard™ 6500⁺ 液质联用质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); Milli-Q Element 超纯水机(美国 Millipore 公司); Multi reax 旋涡混匀器(德国 Heidolph 公司); 3-30K 超高速冷冻离心机(美国 SIGMA 公司); H1650-W 微型高速台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发公司); N-EVAP™ 112 型氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司); DK-2200P 超声仪(中国德康公司); MS205DU 电子分析天平(感量 0.00001 g)、MS1003TS 电子分析天平(感量 0.001g)(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

称取样品 1 g 左右(精确到 0.001 g)于 50 mL 离心管, 加入 5 mL 超纯水, 超声 5 min 后, 用氨水调节 pH 为 11, 再加入 10 mL 乙腈, 涡旋混匀 10 min 后加入 1.5 g NaCl, 继续涡旋 5 min, 随后 10000 r/min, 离心 5 min。取 1 mL 上层有机相于 45°C 水浴中以氮气吹干, 加入 1 mL 40% 甲醇水溶液复溶混匀后, 15000 r/min, 离心 5 min, 溶液过 0.22 μm 聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)针头式滤膜后供测定。

1.3.2 生物碱标准溶液配制

称取适量各生物碱的标准品分别置于不同的 10 mL 棕色容量瓶, 加入甲醇溶解并定容至刻度, 分别得到质量浓度为 1.0 mg/mL 的生物碱单标储备液。用移液器分别吸取各生物碱的单标储备液 100 μL 置于另一个 10 mL 棕色容量瓶, 用甲醇定容至刻度后得到质量浓度为 10.0 μg/mL 的生物碱混合标准中间液。每次临用时, 用甲醇将 10.0 μg/mL 的生物碱混合标准中间液逐级稀释为 1.0 μg/mL 和 0.1 μg/mL 的混合标准工作液, 取适量混合标准工作液用 40% 甲醇水溶液配成标准系列曲线。

1.3.3 色谱质谱条件

(1) 色谱条件

Waters XBridge® BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.5 μm); 流动相: 水相(A 相)为 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲酸铵水溶液, 有机相(B 相)为乙腈; 梯度洗脱参数: 0~0.1 min, 10% B; 0.1~8.0 min, 10%~50% B; 8.0~8.5 min, 50%~95% B; 8.5~10.5 min, 保持 95% B; 10.5~11.0 min, 95%~10% B; 11.0~13.0 min, 保持 10% B; 柱温: 40°C; 样品盘温度: 15°C; 流速: 0.35 mL/min; 进样体积: 1 μL。

(2) 质谱条件

电喷雾离子源正离子多反应监测模式; 离子化电压: 5500 V; 离子源温度: 450°C; 气帘气压力和雾化气压力: 50 psi; 辅助气压力: 30 psi; 碰撞气流速级别: 9; 碰撞池出口电压: 9.5 V; 驻留时间: 25 ms。

1.4 数据处理

采用 MultiQuant 3.0.3、Excel 2021 和 Origin 8.5 软件分别进行检测数据提取、结果计算、图表制作和图谱绘制。加标样品平行测定 6 次, 加标回收实验结果以平均回收率±相对标准偏差表示; 实际样品平行测定 3 次, 测定结果以平均测定值±标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 质谱色谱条件优化

2.1.1 质谱条件优化

大部分生物碱都具有含氮的碱性环状结构, 容易被质子化形成[M+H]⁺离子, 适合在正离子模式下进行测定。采用针泵注射的方式, 分别将质量浓度为 100 ng/mL 的 14 种生物碱单标溶液注入质谱进行参数优化。先在 Q1 Scan 模式下找出相应的母离子, 然后通过 Product Ion(MS2)模式找出 2 个响应较高的子离子, 最后在多反应监测模式下分别对母离子的去簇电压(declustering potential, DP)和子离子的碰撞能量(collision energy, CE)进行优化。14 种生物碱优化后的质谱参数见表 1。

2.1.2 色谱条件优化

基于方法的通用性和目标物的性质, 本研究选择了常规的 BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.5 μm)作为实验用柱。甲醇和乙腈为常用的有机相, 通过比较发现, 使用乙腈作为有机相时, 色谱柱的柱压比有机相为甲醇时低, 且使用乙腈作流动相时目标物的峰型相对更好。比较了水相分别为纯水、5 mmol/L 甲酸铵水溶液和 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲酸铵水溶液时, 14 种生物碱的色谱分离情况。实验发现, 当使用纯水为水相时, 目标物的峰型、信号响应和分离度都不理想。加入甲酸铵后, 峰型和信号响应均得到改善。同时引入一定量的甲酸, 发现各目标物的信号响应得到进一步的提高, 色谱峰的分离度也有所改善。因此实验的流动相确定为 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲酸铵水溶液和乙腈。在优化的梯度洗脱条件下, 14 种生物碱能在 8 min 内完成出峰, 各目标物的多反应监测谱图见图 1, 各目标物的相关信息及保留时间见表 1。

表 1 14 种生物碱的质谱参数及相关信息

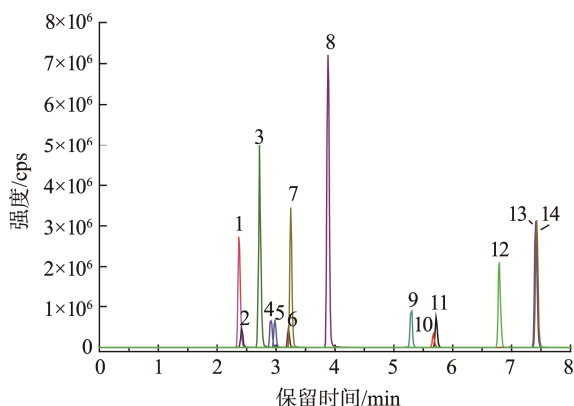
Table 1 Mass parameters and relative information for 14 kinds of alkaloids

目标物	CAS 号	保留时间/min	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞能量/V
东莨菪碱	51-34-3	2.36	304.2	138.1 [*] /156.1	90	29/23
钩吻素甲	509-15-9	2.41	323.2	236.2 [*] /195.0	125	35/49
毒扁豆碱	57-47-6	2.71	276.3	219.0 [*] /162.1	30	15/25
番木鳖碱	57-24-9	2.90	335.2	184.1 [*] /156.1	140	52/61
马钱子碱	357-57-3	2.97	395.1	324.1 [*] /244.1	120	44/50
钩吻素子	1358-76-5	3.20	307.1	180.1 [*] /204.1	120	56/61
莨菪碱	101-31-5	3.24	290.1	124.1 [*] /93.0	100	31/38
钩吻素己	82354-38-9	3.87	327.2	296.3 [*] /265.2	30	25/38

表 1(续)

目标物	CAS 号	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/V
秋水仙碱	64-86-8	5.30	400.2	358.1 [*] /310.1	120	29/40
α -茄碱	20562-02-1	5.66	868.5	398.4 [*] /722.5	170	100/93
α -卡茄碱	20562-03-2	5.72	852.6	706.5 [*] /398.5	170	92/96
新乌头碱	2752-64-9	6.78	632.4	572.3 [*] /354.2	160	44/56
次乌头碱	6900-87-4	7.39	616.3	556.3 [*] /524.3	160	45/47
乌头碱	302-27-2	7.41	646.3	586.3 [*] /526.3	160	47/53

注: ^{*}定量离子。



注: 1: 东莨菪碱; 2: 钩吻素甲; 3: 毒扁豆碱; 4: 番木鳖碱; 5: 马钱子碱; 6: 钩吻素子; 7: 莨菪碱; 8: 钩吻素己; 9: 秋水仙碱; 10: α -茄碱; 11: α -卡茄碱; 12: 新乌头碱; 13: 次乌头碱; 14: 乌头碱

图 1 20.0 ng/mL 标准溶液中 14 种生物碱的多反应监测谱图
Fig.1 Multiple reaction monitoring spectrogram for 14 kinds of alkaloids in 20.0 ng/mL standard solution

2.2 前处理条件优化

2.2.1 提取条件的选择

糕点样品含水量低, 加入适量的水, 有助于增强提取试剂的渗透能力, 以便于提取试剂渗透到基质中, 从而提高回收率。本研究中, 待测生物碱的种类较多, 包括乌头类(乌头碱、次乌头碱、新乌头碱)、颠茄碱类(莨菪碱、东

莨菪碱)、钩吻类(钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己)、龙葵碱类(α -茄碱、 α -卡茄碱)、马钱子类(番木鳖碱、马钱子碱)、有机胺类(秋水仙碱)等, 性质差异较大, 在不同溶剂中的溶解度不同。但待测的生物碱在乙腈和甲醇中均有良好的溶解性, 因此选择二者作为提取试剂进行考察。通过实验发现, 使用甲醇作为提取试剂时, 加入氯化钠无法产生盐析分层, 因此最终选择乙腈作为提取试剂。进一步考察了乙腈和氯化钠的加入量对生物碱回收率的影响, 结果显示乙腈和氯化钠分别为 10 mL 和 1.5 g 时, 各目标物均有较好的回收率。

相关研究^[16,22]发现, 在碱性条件下能形成易溶于有机溶剂的游离态生物碱, 且 pH 越高, 生物碱越容易被有机溶剂提取。根据这一性质, 通过加入氨水或氢氧化钠来调节样品的 pH 环境, 考察 pH 对目标物回收率的影响。分别在不调节 pH、pH 为 10~12 的条件下, 进行平行 6 份空白基质加标样品(加标水平为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的回收实验。总体结果显示(图 2), 不调节 pH 时, 各目标物平均回收率偏低, 其中 α -茄碱和 α -卡茄碱的平均回收率分别为 34.8%、51.3%。在一定范围内提高 pH, 对各目标物的回收率均有不同程度的提高, pH 为 11 时各目标物平均回收率均大于 80%。当 pH 提高为 12 时, 回收率并没有进一步提高的趋势, 因此选择将样品 pH 环境调节为 11 后, 再进行下一步操作。

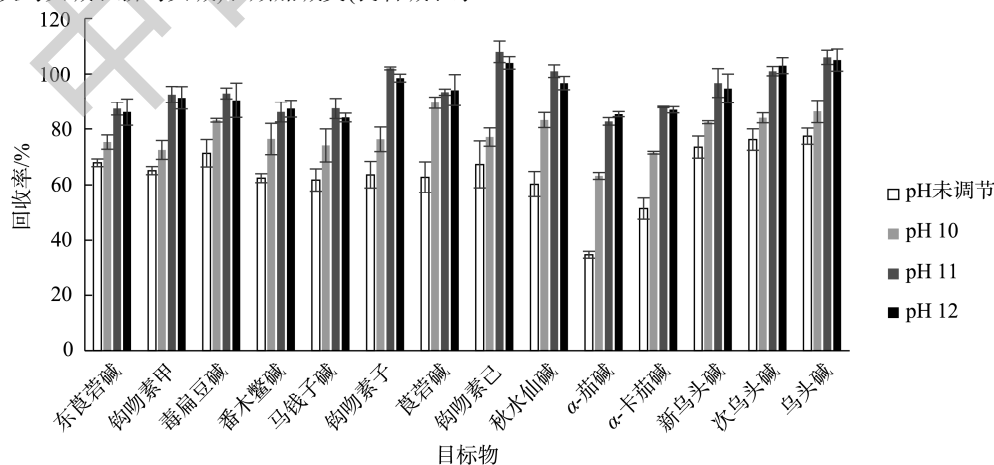


图 2 pH 对 14 种生物碱回收率的影响($n=6$)

Fig.2 Effects of pH on recoveries of 14 kinds of alkaloids ($n=6$)

2.2.2 净化条件的选择

面对基质复杂的样品, 为避免杂质的干扰, 降低基质效应, 通常会进行必要的净化处理。本实验比较了不净化、分散固相萃取净化包 1 [150 mg MgSO₄, 25 mg N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)]、分散固相萃取净化包 2 (150 mg MgSO₄, 25 mg C₁₈) 3 种方式对目标物测定的影响。结果表明, 无论有否使用分散固相萃取净化包, 目标物出峰处均没有出现杂质峰干扰, 且不净化与使用分散固相萃取净化包 2 的效果相近, 各目标物回收率相当。使用分散固相萃取净化包 1 后, α -茄碱和 α -卡茄碱的回收率均有明显下降, 其余目标物的回收率与不净化时相当。其中分散固相萃取净化包 1 中含有 PSA, 可有效吸附有机酸、糖类、含羧基和羟基的杂质^[30]。然而 α -茄碱和 α -卡茄碱的分子结构也含有多个羟基基团, 因此能被 PSA 有所吸附, 从而造成回收率下降。上述实验结果表明, 样品经过盐析辅助乙腈萃取和高速离心后, 无需进一步净化也能达到较好的实验效果。其原因可能是乙腈对蛋白质有较强的沉淀作用且共提取物较少, 大部分杂质经离心后沉淀或留在水层, 结合盐析辅助使得提取了目标物的乙腈层和样品水层分离, 从而起到较好的除杂效果, 降低基质效应的影响。因此无需增加净化步骤, 简化流程, 有利于提高中毒应急检测的工作效率。

2.3 基质效应的评价

按照本研究 1.3.1 中的样品前处理方法, 得到栳榧饼、艾草饼、土茯苓糕、芝麻糕 4 种空白基质提取液。分别使用空白基质提取液和 40% 甲醇水作为定容液, 配制成相同浓度的待测溶液, 在优化过的色谱质谱条件下进行测定。然后得到空白基质液与 40% 甲醇水中各目标物的响应值, 通过计算二者比值的百分比来评价各目标物的基质效应(matrix effect, ME)。当结果大于 100% 时, 说明具有基质增强效应; 当结果小于 100% 时, 则为基质减弱效应。结果越接近 100%, 说明基质效应越小。结果显示, 在栳榧饼、艾草饼、土茯苓糕、芝麻糕中各待测物的基质效应分别为 77.3%~86.1%、79.5%~83.4%、80.3%~94.2%、78.1%~89.5%, 说明 4 种基质对待测物均有基质抑制效应, 但影响不明显, 因此后续实验选择使用溶剂标准曲线进行结果校正, 以期减少因配制基质标准曲线带来的不便, 进一步提高实际工作中的检测效率。

2.4 方法的线性范围、检出限和定量限

取 1.3.2 中的混合标准工作液, 用 40% 甲醇水溶液配制成 0.5~100.0 ng/mL 的标准系列溶液, 经 1.3.3 的仪器条件分析后, 绘制标准曲线, 所得 14 种目标物线性方程的相关系数(r)均 ≥ 0.999 。以 3 倍信噪比($S/N=3$)和 10 倍信噪比($S/N=10$) 分别计算得到各目标物的检出限(limits of detection, LODs)和定量限(limits of quantitation, LOQs)。14

种生物碱的线性关系、LODs 和 LOQs 见表 2。

表 2 14 种生物碱的线性关系、检出限和定量限
Table 2 Linear relationship, LODs and LOQs of 14 kinds of alkaloids

目标物	线性方程	r	LODs / ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQs / ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
东莨菪碱	$Y=3.49 \times 10^5 X + 2.18 \times 10^5$	0.9997	0.2	0.6
钩吻素甲	$Y=6.72 \times 10^4 X - 1.24 \times 10^4$	0.9994	0.9	2.9
毒扁豆碱	$Y=6.32 \times 10^5 X + 5.02 \times 10^3$	0.9999	0.3	0.9
番木鳖碱	$Y=1.03 \times 10^5 X - 2.28 \times 10^4$	0.9995	1.1	3.4
马钱子碱	$Y=8.76 \times 10^4 X - 7.40 \times 10^3$	0.9999	0.7	2.3
钩吻素子	$Y=5.46 \times 10^4 X + 3.29 \times 10^4$	0.9994	2.2	7.1
莨菪碱	$Y=4.35 \times 10^5 X + 1.44 \times 10^5$	0.9999	0.2	0.6
钩吻素己	$Y=9.29 \times 10^5 X + 3.43 \times 10^5$	0.9992	0.1	0.3
秋水仙碱	$Y=1.22 \times 10^5 X - 1.18 \times 10^4$	0.9990	0.4	1.3
α -茄碱	$Y=4.40 \times 10^4 X - 2.07 \times 10^3$	0.9998	1.0	3.1
α -卡茄碱	$Y=9.50 \times 10^4 X - 2.16 \times 10^4$	0.9993	0.3	0.8
新乌头碱	$Y=2.75 \times 10^5 X + 7.75 \times 10^4$	0.9996	0.3	1.0
次乌头碱	$Y=4.53 \times 10^5 X + 4.33 \times 10^4$	0.9999	0.2	0.5
乌头碱	$Y=4.83 \times 10^5 X - 2.10 \times 10^4$	0.9992	0.2	0.4

2.5 加标回收率和精密度

分别在栳榧饼、艾草饼、土茯苓糕、芝麻糕的空白基质中加入 8.00、50.0、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个浓度水平进行加标回收实验, 每种基质各浓度水平分别进行 6 次平行实验, 溶剂标准曲线外标法定量, 同时计算加标回收率和相对标准偏差。由表 3 可知, 各基质中 14 种生物碱的平均回收率为 76.3%~105.7%, 相对标准偏差范围在 1.2%~9.8% 之间, 实验所得的回收率和相对标准偏差范围均符合 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中相应的技术要求。

2.6 实际样品的检测

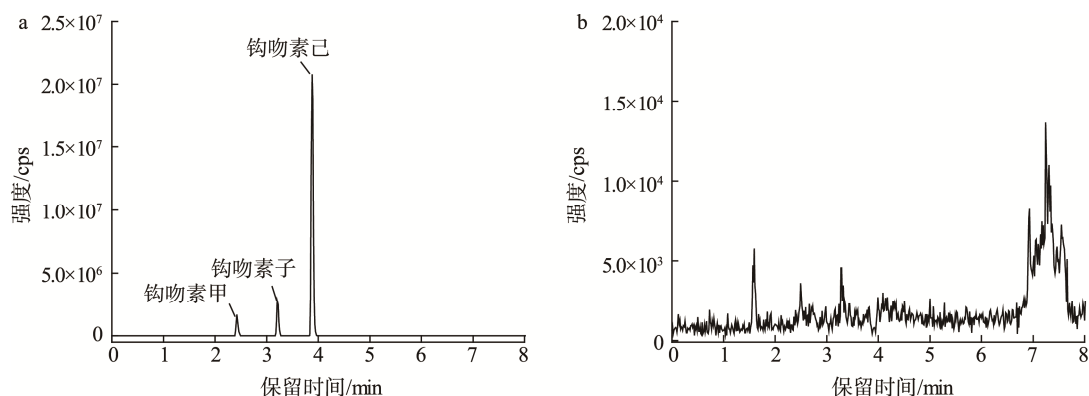
使用上述优化后的分析方法, 对 8 份市售的糕点和 2 份疑似引起生物碱食物中毒的草药糍粑进行了检测, 结果为 8 份市售糕点均未检出上述 14 种生物碱, 2 份送检样品均检出钩吻素甲、钩吻素子和钩吻素己 3 种钩吻类生物碱, 具体含量见表 4, 阳性样品(生糍粑)和阴性样品(栳榧饼)的总离子流图见图 3。因没有采集到用于制作该糍粑的草药原样, 无法结合植物形态学进行判断。但钩吻碱是钩吻属植物的主要毒性成分和特征生物碱^[31], 根据样品的检测分析结果, 推测可能因食用含钩吻属植物的食品引发了中毒。

表 3 不同糕点中 14 种生物碱的加标回收率($n=6$)
Table 3 Spiked recoveries of 14 kinds of alkaloids in different pastries ($n=6$)

目标物	加标量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%			
		栳樺饼	艾草饼	土茯苓糕	芝麻糕
东莨菪碱	8.00	98.4 \pm 6.9	86.3 \pm 1.7	96.7 \pm 4.2	91.5 \pm 2.3
	50.00	105.6 \pm 2.5	94.5 \pm 3.8	105.0 \pm 4.4	92.4 \pm 1.5
	200.00	99.2 \pm 1.9	96.2 \pm 6.3	96.3 \pm 3.5	89.2 \pm 3.9
钩吻素甲	8.00	90.5 \pm 8.3	82.6 \pm 6.7	98.7 \pm 3.6	93.4 \pm 5.6
	50.00	103.1 \pm 1.9	85.7 \pm 5.3	98.7 \pm 6.5	102.4 \pm 6.4
	200.00	101.3 \pm 1.2	93.6 \pm 4.2	95.8 \pm 2.9	98.6 \pm 5.5
毒扁豆碱	8.00	101.7 \pm 5.2	98.5 \pm 3.8	103.2 \pm 4.3	92.6 \pm 3.7
	50.00	102.4 \pm 3.3	101.2 \pm 4.2	105.4 \pm 2.8	96.6 \pm 5.9
	200.00	105.4 \pm 4.3	96.3 \pm 4.4	102.2 \pm 6.9	96.3 \pm 1.4
番木鳖碱	8.00	95.0 \pm 9.8	87.1 \pm 1.5	101.5 \pm 5.5	87.7 \pm 6.8
	50.00	104.5 \pm 2.0	96.3 \pm 2.8	101.0 \pm 4.0	92.9 \pm 1.8
	200.00	96.8 \pm 5.1	104.3 \pm 3.5	93.9 \pm 3.5	94.1 \pm 5.9
马钱子碱	8.00	97.7 \pm 8.8	92.4 \pm 3.3	96.8 \pm 5.1	89.9 \pm 2.1
	50.00	104.0 \pm 2.7	95.4 \pm 4.9	98.7 \pm 5.5	85.0 \pm 2.4
	200.00	99.4 \pm 3.7	93.1 \pm 2.9	94.9 \pm 5.6	87.7 \pm 4.8
钩吻素子	8.00	83.3 \pm 7.8	103.5 \pm 3.7	92.8 \pm 4.4	91.8 \pm 8.2
	50.00	105.4 \pm 4.1	97.6 \pm 6.5	102.1 \pm 4.2	90.2 \pm 1.3
	200.00	96.6 \pm 3.0	102.6 \pm 3.0	97.9 \pm 6.7	96.9 \pm 3.4
莨菪碱	8.00	98.9 \pm 7.3	88.3 \pm 4.1	104.1 \pm 5.1	102.8 \pm 3.1
	50.00	101.4 \pm 2.4	92.5 \pm 6.6	103.4 \pm 3.9	98.3 \pm 2.5
	200.00	103.2 \pm 2.5	97.4 \pm 4.0	105.7 \pm 3.9	93.3 \pm 2.4
钩吻素己	8.00	97.3 \pm 8.6	89.7 \pm 5.1	102.2 \pm 4.1	87.7 \pm 2.1
	50.00	104.2 \pm 2.8	97.3 \pm 3.9	101.5 \pm 6.7	92.7 \pm 7.3
	200.00	101.1 \pm 2.3	101.5 \pm 3.9	103.2 \pm 4.0	99.8 \pm 1.7
秋水仙碱	8.00	94.7 \pm 8.6	95.4 \pm 4.1	97.2 \pm 3.7	92.9 \pm 3.1
	50.00	100.8 \pm 3.7	93.2 \pm 4.7	101.0 \pm 4.0	88.1 \pm 2.3
	200.00	100.1 \pm 3.9	102.1 \pm 3.6	98.5 \pm 4.4	94.1 \pm 3.7
α -茄碱	8.00	76.3 \pm 7.6	78.9 \pm 4.5	83.6 \pm 6.7	78.4 \pm 5.1
	50.00	86.8 \pm 3.4	79.6 \pm 3.0	85.5 \pm 5.3	76.9 \pm 4.9
	200.00	83.9 \pm 1.2	84.5 \pm 6.9	91.0 \pm 4.2	83.6 \pm 5.8
α -卡茄碱	8.00	94.8 \pm 6.4	85.3 \pm 3.7	96.4 \pm 1.7	87.6 \pm 6.9
	50.00	98.6 \pm 2.8	82.6 \pm 5.5	97.0 \pm 3.8	94.3 \pm 5.4
	200.00	100.2 \pm 3.5	86.6 \pm 4.4	99.1 \pm 6.3	92.4 \pm 2.7
新乌头碱	8.00	94.4 \pm 2.3	102.5 \pm 5.1	102.3 \pm 3.3	95.7 \pm 7.3
	50.00	105.7 \pm 4.1	98.7 \pm 4.0	101.5 \pm 4.9	104.3 \pm 3.0
	200.00	102.6 \pm 3.3	103.8 \pm 5.6	105.6 \pm 2.9	103.5 \pm 2.6
次乌头碱	8.00	91.7 \pm 4.3	96.7 \pm 5.6	101.2 \pm 1.5	98.6 \pm 3.0
	50.00	101.9 \pm 2.5	104.5 \pm 4.0	100.6 \pm 2.8	97.9 \pm 1.2
	200.00	97.4 \pm 2.7	103.4 \pm 3.6	95.5 \pm 3.5	99.2 \pm 4.3
乌头碱	8.00	97.5 \pm 6.6	93.8 \pm 4.5	103.7 \pm 3.8	103.8 \pm 7.1
	50.00	104.6 \pm 2.0	105.3 \pm 4.2	98.9 \pm 4.2	95.6 \pm 5.5
	200.00	105.2 \pm 4.0	99.5 \pm 6.6	96.5 \pm 4.4	101.8 \pm 2.5

表 4 送检样品中钩吻素甲、钩吻素子、钩吻素己的含量($n=3$)
Table 4 Contents of gelsemine, koumine and gelsenicine in the submitted samples ($n=3$)

样品	钩吻素甲	钩吻素子	钩吻素己
生糍粑/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	8035.3 \pm 133.4	12412.9 \pm 127.4	7573.1 \pm 136.9
熟糍粑/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	8043.2 \pm 145.5	11815.1 \pm 36.2	6305.4 \pm 241.7



注: a: 阳性样品(生糍粑, 200 倍稀释); b: 阴性样品(栾櫟饼)。

图 3 阳性样品和阴性样品的总离子流图

Fig.3 Total ion chromatograms of positive sample and negative sample

3 结 论

本研究基于盐析辅助液萃取的前处理方法, 建立了超高效液相色谱-串联质谱法快速测定糕点中 14 种常见有毒生物碱的检测方法。充分利用了乙腈对不同极性目标物的提取效果好, 对糖分、脂类、有机酸等杂质的溶解性低, 且能沉淀蛋白等优势, 结合盐析辅助技术使目标物得到有效提取和净化。与已有的文献方法相比^[11-12,27], 本研究优化了样品前处理的流程, 定量方法也更为灵活, 使用溶剂标准曲线外标法定量即可, 无需使用特定的基质匹配曲线, 进一步提高了检测效率。本研究方法操作简单、方便快捷, 回收率、精密性、线性范围、检出限等参数满足方法学考察要求, 可为生物碱应急中毒事件的快速筛查和定量分析提供检测技术支持, 今后可进一步拓展应用于其他食品种类和生物材料中生物碱的分析检测。

参考文献

- [1] KAUR R, ARORA S. Alkaloids-Important therapeutic secondary metabolites of plants origin [J]. *J Crit Rev*, 2015, 2(3): 1-8.
- [2] 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.
BO YJ, YU M, ZHAO SW, *et al.* Study on pharmacological effect and mechanism of alkaloids [J]. *J Harbin Commer Univ (Nat Sci Ed)*, 2013, 29(1): 8-11.
- [3] 肖章武, 马莉. 急性重症秋水仙碱中毒治疗分析[J]. *临床急诊杂志*, 2018, 19(4): 258-260.
XIAO ZW, MA L. Analysis of treatment on acute severe colchicine poisoning [J]. *J Clin Emerg*, 2018, 19(4): 258-260.
- [4] 麦沛明, 朱炳辉, 余胜兵, 等. 有毒生物碱中毒及检测的研究进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(24): 3638-3641, 3644.
MAI PM, ZHU BH, YU SB, *et al.* Recent advances in the poisoning and detection of toxic alkaloids [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, 24(24): 3638-3641, 3644.
- [5] CHRISTIAN OM, MARIA R, EYLERT B, *et al.* Recurrent malignant ventricular arrhythmias and paresthesia-a mystery revealed as aconitine poisoning: A case report [J]. *J Med Case Rep*, 2023, 17(1): 554.
- [6] MITRA R, REZA A, HOSSEIN H, *et al.* Clinical manifestations and outcomes of colchicine poisoning cases, a cross sectional study [J]. *Arch Acad Emerg Med*, 2020, 8(1): e53.
- [7] 张雪宝, 阮峰, 焦亮, 等. 一起钩吻碱甲引起的食物中毒暴发调查[J]. *河南预防医学杂志*, 2019, 30(10): 794-796.
ZHANG XB, RUAN F, JIAO L, *et al.* Investigation of food poisoning outbreaks caused by gelsemine [J]. *Henan J Prev Med*, 2019, 30(10): 794-796.
- [8] 徐皓轩, 王圣贤, 吴香伦, 等. 一起农村宴席误饮曼陀罗籽药酒导致食物中毒事件的调查[J]. *实用预防医学*, 2022, 29(11): 1388-1390.
XU HX, WANG SX, WU XL, *et al.* Survey on a food poisoning incident caused by drinking medicated wine with mandala seeds at a rural banquet [J]. *Pract Prev Med*, 2022, 29(11): 1388-1390.
- [9] 刘思佳, 徐宝丽, 唐勇, 等. 不明原因中毒 1 例诊治分析[J]. *实用检验医师杂志*, 2023, 15(2): 209-211.
LIU SJ, XU BL, TANG Y, *et al.* Analysis of diagnosis and treatment of a case of intoxication of unknown cause [J]. *Chin J Clin Pathol*, 2023, 15(2): 209-211.
- [10] 刘峰, 张银豪, 马明阳, 等. 液相色谱-串联质谱法检测一起误食曼陀罗引起的食物中毒物质[J]. *中国食品卫生杂志*, 2022, 34(2): 377-381.
LIU F, ZHANG YH, MA MY, *et al.* Identify the toxicological factors of a food poisoning caused by ingestion of *Datura stramonium* L. using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2022, 34(2): 377-381.
- [11] 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 α -茄碱和 α -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 China J Prev Med*, 2016, 42(5): 435-442.
- [12] 贺琪, 黄玲凤, 李忠达, 等. HPLC-MS 法同时检测多类食品中 20 种有害生物碱含量[J]. *闽南师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 3: 54-62.
HE Q, HUANG LF, LI ZD, *et al.* Simultaneous determination of over twenty kinds of harmful alkaloid in food by HPLC-MS [J]. *J Minnan Normal Univ (Nat Sci Ed)*, 2017, 3: 54-62.
- [13] 樊轻亚, 白泽方, 汪学猛, 等. 分散固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定药用狗牙花中 6 种生物碱[J]. *分析测试学报*, 2022, 41(8):

- 1235–1241.
- FAN QY, BAI ZF, WANG XM, *et al.* Determination of six alkaloids in *ervatamia officinalis* tsiang by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with dispersive solid phase extraction [J]. *J Instrum Anal*, 2022, 41(8): 1235–1241.
- [14] SERENA R, RITA C, LUCA C, *et al.* Salting-out assisted liquid-liquid extraction for the rapid and simple simultaneous analysis of pyrrolizidine alkaloids and related N-oxides in honey and pollen [J]. *J Food Compos Anal*, 2022, 108: 104457.
- [15] WANG DX, WANG XC, HU QJ, *et al.* Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled to dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of bisphenol A and six analogs (B, E, F, S, BADGE, BFDGE) in canned coffee drinks by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Anal Methods*, 2020, 14(3): 1–12.
- [16] FADI A, VANESSA L, JOHN HM. salting-out-assisted liquid-liquid extraction method for the determination of nicotine from oral traditional and innovative tobacco products using UPLC-MS/MS [J]. *ACS Omega*, 2023, 8(34): 31256–31264.
- [17] LI ML, WANG HX, HUAN XH, *et al.* Simultaneous LC-MS/MS bioanalysis of alkaloids, terpenoids, and flavonoids in rat plasma through salting-out-assisted liquid-liquid extraction after oral administration of extract from *Tetradium ruticarpum* and *Glycyrrhiza uralensis*: A sample preparation strategy to broaden analyte coverage of herbal medicines [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(23): 5871–5884.
- [18] MASARU T, TOMIAKI M, HITOSHI M, *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 Pharm Biomed Anal*, 2020, 192: 113676.
- [19] 张秀尧, 蔡欣欣, 张晓艺, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱法同时快速测定血浆和尿液中 84 种有毒植物成分[J]. 色谱, 2019, 37(11): 1142–1156.
- ZHANG XR, CAI XX, ZHANG XY, *et al.* Simultaneous rapid determination of 84 toxic plant constituents in plasma and urine by ultra-performance liquid chromatography- triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(11): 1142–1156.
- [20] 陈杰, 钟延旭, 雷宁生. 应用液质联用法(LC-MS/MS)快速测定药酒中 11 种钩吻生物碱的含量[J]. 应用预防医学, 2023, 29(5): 321–324, 329.
- CHEN J, ZHONG YX, LEI NS. Rapid determination of the levels of 11 *Gelsemium alkaloids* in medicinal liquor by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. *Appl Prev Med*, 2023, 29(5): 321–324, 329.
- [21] CHMIT SM, WAHRIG B, BEUERLE T. Quantitative and qualitative analysis of pyrrolizidine alkaloids in liqueurs, elixirs and herbal juices [J]. *Fitoterapia*, 2019, 136: 104172.
- [22] 廖仕成, 李荷丽, 刘红河, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(1): 141–149.
- LIAO SC, LI LH, LIU HH, *et al.* Simultaneous determination of 23 kinds of toxic alkaloids in Chinese medicinal materials and plant-derived food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(1): 141–149.
- [23] NG SW, CHING CK CHAN AY, *et al.* Simultaneous detection of 22 toxic plant alkaloids (aconitum alkaloids, solanaceous tropane alkaloids, sophora alkaloids, *Strychnos alkaloids* and colchicine) in human urine and herbal samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 942–943: 63–69.
- [24] EWELINA K, KRZYSZTOF K. Simultaneous determination of pyrrolizidine and tropane alkaloids in honey by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Vet Res*, 2022, 66(2): 235–243.
- [25] 刘先军, 冯家力, 曾栋, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中 16 种生物碱[J]. 实用预防医学, 2023, 30(8): 922–926.
- LIU XJ, FENG JL, ZENG D, *et al.* Simultaneous determination of 16 kinds of alkaloids in honey by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Pract Prev Med*, 2023, 30(8): 922–926.
- [26] LORENA GG, SONIA MZ, JORGE P, *et al.* Improved analytical approach for determination of tropane alkaloids in leafy vegetables based on μ -QuEChERS combined with HPLC-MS/MS [J]. *Toxins*, 2022, 14(10): 650–665.
- [27] 范素芳, 马俊美, 刘苗, 等. 高效液相色谱-串联质谱测定食品中 15 种有毒生物碱[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 283–288.
- FAN SF, MA JM, LIU Z, *et al.* Determination of 15 toxic alkaloids in food samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2018, 39(22): 283–288.
- [28] 吴琼, 扈明洁, 江海, 等. 分散固相萃取结合通过式固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定火锅底料中 5 种罂粟壳生物碱[J]. 分析科学学报, 2021, 37(2): 205–210.
- WU Q, HU MJ, JIANG H, *et al.* Determination of 5 alkaloids from pericarpium papaveris in hot pot soup base by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with dispersive and pass-through solid-phase extraction [J]. *J Anal Sci*, 2021, 37(2): 205–210.
- [29] SONG J, GUO TR, WU WL, *et al.* Simultaneous determination of five poppy husk alkaloids and three main components of acetaminophen-caffeine-aspirin tablets in hot pot broth by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Sep Sci Plus*, 2022, 5(11): 616–625.
- [30] 张煜卓. QuEChERS 联合 GC-MS/MS 对坚果与水果中农药多残留检测方法建立及应用研究[D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2019.
- ZHANG YZ. Study on establishment and application of QuEChERS combined with GC-MS/MS for detection of pesticide residues in nuts and fruits [D]. Shenyang: Shenyang Normal University, 2019.
- [31] 李玉美. 中药钩吻的研究现状[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(20): 8638–8639.
- LI MY. Research Situation of *Gelsemium elegans* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2008, 36(20): 8638–8639.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)

作者简介



黄莹偲, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品安全检测方向。

E-mail: huangys1104@163.com