

实验技术与方法

超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法快速检测曼陀罗中毒事件中有毒物质

周荣贵,寇金蟾,张永泓,林佶

(云南省疾病预防控制中心(云南省预防医学科学院),云南省公共卫生与生物安全重点实验室,云南昆明 650500)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法(UPLC/Q-TOF-MS)快速定性定量检测曼陀罗中毒事件中的有毒物质。方法 样品经甲醇提取后,待测液经 ACQUITY UPLC® BEH C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)分离,以 A 相 0.01% 甲酸水和 B 相 乙腈为流动相,进样量 2.0 μL,柱温 35 °C,流速 0.2 μL/min,经 ESI 正离子模式采集,以质谱精确分子量和色谱峰保留时间做定性分析,[M]⁺H 为定量离子做定量分析。结果 在 1.0~200.0 ng/mL 范围内 3 种有毒物质线性关系良好, r^2 均 ≥ 0.999 ;检出限为 1.00~2.24 ng/mL,定量限为 0.27~7.46 ng/mL;三水平加标回收率在 78%~89%,相对标准偏差(RSD)均 $\leq 3.0\%$ 。两起中毒事件中曼陀罗样品检出东莨菪碱含量 0.65 mg/kg、山莨菪碱 0.66 mg/kg 和莨菪碱 0.72 mg/kg;曼陀罗泡酒样品中检出东莨菪碱含量 0.004 8 mg/kg、山莨菪碱 0.041 mg/kg 和莨菪碱 0.16 mg/kg;在数名中毒患者的血液和尿液样本中不同程度检出东莨菪碱、莨菪碱和山莨菪碱。结论 实验室建立的 UPLC/Q-TOF-MS 快速、高效、准确度高,适用于曼陀罗中毒事件中有毒物质的定性定量检测,两起中毒事件是因食用曼陀罗和曼陀罗泡酒引起的。

关键词:曼陀罗;食源性疾病;超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2025)04-0327-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2025.04.004

An UPLC/Q-TOF-MS method for the detection of toxic substances in *Datura stramonium* L.

ZHOU Ronggui, KOU Jinchan, ZHANG Yonghong, LIN Ji

(Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention (Yunnan Provincial Academy of Preventive Medicine), Yunnan Provincial Key Laboratory of Public Health and Biosafety&Health Laboratories Center, Yunnan Kunming 650500, China)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) method for rapid screening of toxic substances in *Datura stramonium* L. . **Methods** After the samples were extracted by methanol, the liquid to be tested was separated on ACQUITY UPLC® BEH C18 column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) with 0.01% formic acid water as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B. The sample volume was 2.0 μL, the column temperature was 35 °C, and the flow rate was 0.2 μL/min. ESI positive ion mode collection, mass spectrometry with precise molecular weight and chromatographic peak retention time for qualitative analysis, [M]⁺H as quantitative ion for quantitative analysis. **Results** The linear ranges were 1.0-200.0 μg/L with $r^2 \geq 0.990$. The limits of detection were 1.00-2.24 ng/mL, and the limits of quantification were 0.27-7.46 ng/mL. The recoveries were in the range of 78%-89% and RSDs were $\leq 3.0\%$. The contents of scopolamine 0.65 mg/kg, anisodamine 0.66 mg/kg and hyoscyamine 0.72 mg/kg were detected in *Datura stramonium* L collected in the field. Scopolamine 0.004 8 mg/kg, anisodamine 0.041 mg/kg and hyoscyamine 0.16 mg/kg were detected in the liquor of *Datura stramonium* L. The target compounds were detected in different degrees in the blood and urine of the poisoned patients. **Conclusion** The UPLC/Q-TOF-MS established in the laboratory is fast, efficient and accurate, which is suitable for the qualitative and quantitative detection of toxic substances in the poisoning incidents of *Datura stramonium* L. Two poisonings were caused by consumption of *Datura stramonium* L.

收稿日期:2024-04-19

作者简介:周荣贵 男 硕士研究生 研究方向为食品中有毒物质检测 E-mail:1078551357@qq.com

通信作者:林佶 男 主任技师 研究方向为生物毒素与食品安全 E-mail:linji666@163.com

Key words: *Datura stramonium* L.; foodborne disease; ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry

曼陀罗全株有毒,主要有毒成分为莨菪烷类生物碱。莨菪烷类生物碱能干扰大脑皮层产生中枢抑制,对中枢神经起作用使大脑延髓兴奋,提高脊髓反射的应激性,引起抽搐和痉挛。曼陀罗中毒患者主要表现为瞳孔散大、谵妄、幻觉等,严重者可发生抽搐、昏迷、心跳停止和死亡,中毒反应一般在食后半小时出现^[1-4]。

2023年11月及2024年2月云南省发生两起食用曼陀罗中毒事件,第一起事件中患者何某(女,64岁)和谢某(女,68岁)一同食用了野菜炖肉后相继出现头昏、神志不清等症状,随后被送往医院治疗,经形态学鉴定食用的野菜为曼陀罗果实。第二起事件中患者糯某(男,40岁)和腊某(男,39岁)在食用曼陀罗泡酒后相继出现呕吐、腹痛、四肢无力等症状,随后被紧急送往医院治疗。4名中毒患者都出现了头晕、头痛、恶心、呕吐、腹痛和神志不清等症状,食用曼陀罗的两名患者出现胡言乱语症状;饮用曼陀罗泡酒的2名患者有四肢无力、全身发麻、呼吸困难和抽搐等神经症状。流行病学调查结果和临床资料提示两起事件的发生均与曼陀罗有关,实验室建立了曼陀罗中有毒物质超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱检测方法(Ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry, UPLC/Q-TOF-MS),对现场采集的曼陀罗植株、剩余食物、血液、尿液进行有毒物质快速筛查,证实这两起中毒事件是由食用曼陀罗引起。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

第一起中毒事件现场流调采集到患者何某和谢某住院当天的血液和尿液各2份,何某家里食用剩余曼陀罗植株1份,曼陀罗植株的根、茎、叶、花和果实各1份,共计10份样品;第二起中毒事件现场流调采集到患者糯某和腊某住院当天的血液2份、腊某尿液1份、腊某家中剩余曼陀罗泡酒1份、糯某家存放的桑葚酒1份和不明泡酒1份、中毒当日饮用剩余泡酒1份、用来泡酒的曼陀罗果实2份和曼陀罗泡酒里的可疑植物1份,共计10份样品。

1.1.2 主要仪器与试剂

Agilent G6550型超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱仪(安捷伦公司,美国),高速匀浆机,

离心机。标准品:东莨菪碱(天津阿尔塔科技有限公司,CAS:51-34-3)、山莨菪碱(天津阿尔塔科技有限公司,CAS:17659-49-3)和莨菪碱(天津阿尔塔科技有限公司,CAS:101-31-5);甲醇(默克公司,德国,HPLC级)、乙腈和甲酸(Fisher公司,美国,HPLC级)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称量东莨菪碱、山莨菪碱和莨菪碱固体标准0.001 g。用乙腈溶解并定容到10 mL,得到100 mg/L单一标准储备液。再准确吸取各单一标准储备液100 μ L,用乙腈溶解并定容到10 mL制成混合标准储备液(1 mg/L),再逐一稀释成1、2、5、10、25、50、100和200 μ g/L各级混合标准使用液。

1.2.2 样品前处理

曼陀罗植物样品:称取2 g样品,剪碎后加入10 mL甲醇用高速匀浆机研磨打碎,超声提取10 min,10 000 r/min离心半径3.1 cm,离心5 min后取上清过0.22 μ m滤膜,取1 mL过膜后的溶液用甲醇定容到10 mL,待上机检测;泡酒里的植物样品处理方法如上。

血液标本:血样经10 000 r/min离心半径3.1 cm,离心5 min后取上清1 mL,加入1 mL甲醇,涡旋后10 000 r/min离心5 min取上清过0.22 μ m尼龙滤膜后待上机检测。

尿液标本:取1 mL尿样加入1 mL甲醇,涡旋后10 000 r/min离心半径3.1 cm,离心5 min后取上清1 mL过0.22 μ m尼龙滤膜后待上机检测。

泡酒样品:取1 mL泡酒用甲醇定容到10 mL,涡旋后过0.22 μ m尼龙滤膜待上机检测。

1.2.3 仪器条件

色谱条件:ACQUITY UPLC[®] BEH C18色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m);进样量2.0 μ L;柱温35 $^{\circ}$ C,流速0.2 μ L/min;流动相A相0.01%甲酸水;B相乙腈;洗脱梯度为:0 min,95%A;0~2.0 min,95%A;2.0~5.0 min,10%A;5.0~7.0 min,10%A;7.0~8.0 min,95%A;8.0~10.0 min,95%A。

质谱条件:采用Dual AJS点喷雾电离正离子(Positive electrospray ionization, ESI⁺)模式,毛细管电压:4.0 kV;雾化器温度:250 $^{\circ}$ C;雾化器压:35 psi;干燥气流速:11.0 L/min;鞘流气流速:8.0 L/min;鞘流气温度:350 $^{\circ}$ C;参比离子为m/z 121.050 873、m/z 322.0248 121、m/z 922.009 798;扫描范围m/z 50~1 000,3种化合物的质谱参数详见表1。

表1 3种化合物的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of the 3 compounds

化合物	分子式	保留时间/min	相对分子质量	碰撞电压/eV	碎片离子(m/z)
东莨菪碱	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	3.320	303.147 06	30	124.112 0/93.069 7*
莨菪碱	C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	3.564	289.167 79	30	138.091 6/121.064 9*
山莨菪碱	C ₁₇ H ₂₃ NO ₄	3.392	305.162 71	30	140.106 8/122.096 2*

注:“*”为定性离子

1.2.4 定性定量方法

采用1.2.3质谱条件参数将样品和标准品上样后得到的数据导入定性分析软件,使用MassHunter PCDL Manager建立的特征谱库,比对样品和标准品,以精确分子量和出峰时间对待测化合物进行定性分析。样品使用外标法,以[M]⁺H作为定量离子进行定量分析。

2 结果

2.1 方法学考察

2.1.1 线性范围、定量限和检出限

标准曲线系列浓度为1、2、5、10、25、50、100和200 μg/L,上机测定得到3个目标化合物的线性方程;以3倍信噪比(S/N)确定检出限(Limit of detection, LOD),以10倍信噪比(S/N)确定定量限(Limit of quantitation, LOQ),结果见表2。3种莨菪烷类生物碱在线性范围内线性关系良好($r^2 \geq 0.999$)。

2.1.2 精密度和稳定性实验

在10、50和100 ng/mL 3个添加水平下分别进针6次,血样、尿样和曼陀罗样品的相对标准偏差为0.2%~3.2%、0.1%~2.6%和0.1%~2.9%,说明该方法精密度好。将浓度为50 ng/mL的3种标准物质混合液在距第一次上样2、4、6、8、10、12、24、48、72 h后进样检测,3种化合物检测结果相对标准偏差均<2.12%,3种物质在检测过程中稳定性良好。

2.1.3 加标回收率

血样、尿样和曼陀罗样品在10、50、100 ng/mL 3个添加水平下的回收率分别为81%~89%、78%~89%、80%~89%,相对标准偏差为0.1%~2.8%、0.1%~2.6%、0.1%~2.9%。

2.2 试验条件优化

2.2.1 样品提取条件优化

植物样品提取采用甲醇超声提取法,优化超声

提取时间,比较超声2、5、10和20 min条件下3种莨菪烷类生物碱提取物总含量。发现3种莨菪烷类生物碱的总含量随着超声时间的增加而增加,因此选定超声10 min作为植物样品的提取条件。血液和尿液样品不需要提取,加入等比例甲醇稀释涡旋离心后过滤膜上机检测。

2.2.2 色谱条件的优化

2.2.2.1 色谱柱的优化

实验室检测为了更好的分离有毒物质,比较了ACQUITY UPLC[®]BEH C18(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)和ACQUITY UPLC[®]HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)两种柱子的分离效果,同一洗脱梯度下C18色谱柱对山莨菪碱有更好的分离效果,为了更直观地比较目标化合物的峰型和出峰时间,选用C18色谱柱进行实验室检测,此外C18色谱柱还具有耐用性、强适应性和兼容多种流动相的优点。

2.2.2.2 流动相和洗脱梯度的优化

乙腈作流动相时,山莨菪碱的响应值更高,在离子流图中峰型更容易被区分,出峰时间接近的东莨菪碱和山莨菪碱也更容易被分开。在确定流动相以后,根据目标化合物色谱峰的保留时间来不断调整流动相在不同时间节点上的构成比例,反复多次实验后发现在0 min, 95%A; 0~2.0 min, 95%A; 2.0~5.0 min, 10%A; 5.0~7.0 min, 10%A; 7.0~8.0 min, 95%A; 8.0~10.0 min, 95%A的洗脱梯度条件下目标化合物能全部分开。

2.3 曼陀罗中毒分析

2.3.1 实验室检测结果

对采集样品进行定量检测,检测含量详见表3。3种莨菪烷类生物碱标准离子流图和质谱图见图1,患者何某血液离子流图和质谱图见图2,患者何某尿液离子流图和质谱图见图3,食用剩余曼陀罗离子流图和质谱图见图4,曼陀罗泡酒离子流和质谱图见图5。

表2 3种化合物的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Calibration curves, correlation coefficients (r^2), LODs and LOQs of 3 kinds of substances

化合物	线性范围/(ng/mL)	回归方程	r^2	检出限/(ng/mL)	定量限/(ng/mL)
东莨菪碱	2~200	$Y=23\ 191X+42\ 415$	0.999 2	1.00	1.32
山莨菪碱	10~200	$Y=2\ 025X+4\ 174$	0.999 7	2.24	7.46
莨菪碱	1~200	$Y=15\ 643X+87\ 309$	0.999 9	1.00	0.27

表3 样品中待测物的含量/(mg/kg)

样品名称	/(mg/kg)		
	东莨菪碱	山莨菪碱	莨菪碱
何某血液	ND	1.23	ND
何某尿液	ND	0.25	0.065
谢某血液	ND	0.11	ND
谢某尿液	ND	0.36	0.17
曼陀罗样品	0.65	0.66	0.72
腊某血液	ND	0.015	ND
腊某尿液	0.027	0.030	0.14
糯某血液	ND	0.007 7	ND
饮用剩余的曼陀罗泡酒	ND	0.074	ND
糯某家里不明泡酒	ND	ND	ND
糯某家里的桑葚酒	ND	ND	ND
糯某家附近的曼陀罗果实	2.72	5.32	3.69
腊某家留存的曼陀罗泡酒	0.004 8	0.041	0.16
曼陀罗泡酒里的果子	0.16	0.49	0.48
腊某家附近的曼陀罗	5.32	1.30	3.44

注:ND表示未检出

2.3.2 曼陀罗定量检测

将现场采集的曼陀罗植株按部位共分为根、茎、叶、花和果实,探究有毒物质含量分布情况。其中东莨菪碱在果实中含量最高,而果实也是最常被人食用的部分。山莨菪碱和莨菪碱在根中含量最大,具体含量见表4。

2.3.3 形态学

现场采集的新鲜曼陀罗植株见图6,专家通过形态学鉴定确认为曼陀罗(*Datura stramonium* L.)。

其形态特征为茎粗壮,圆柱状,淡绿色或带紫色,下部木质化;叶为广卵形,顶端渐尖,基部不对称楔形,边缘有不规则波状浅裂;果实为蒴果直立,长约4 cm,宽约3 cm,表面密生硬刺。

2.3.4 异常指标

医院检验报告中见患者腊某谷丙转氨酶(78,9~50 U/L)、谷草转氨酶(57,5~40 U/L)和 γ -谷氨酰基转移酶(211,10~60 U/L);患者糯某白介素46水平(310.90,0~5.5 pg/mL)、肌红蛋白水平(1 145.99,0~80 ng/mL),这些异常指标的出现提示曼陀罗中毒会对患者的肝肾功能造成损害。血液检查发现糯某作为一名艾滋病病毒携带者,在免疫系统受损情况下当中毒反应发生时,死亡的风险增加。研究这些异常指标出现的原因或将会对曼陀罗中毒机制有更深入的认识。

3 小结

据文献报道,一次性服用东莨菪碱超过0.5 mg就会发生中毒反应^[4],成人体内莨菪碱半数致死剂量 $LD_{50}>10$ mg、东莨菪碱 $LD_{50}>2$ mg^[5-6]。实验室检测结果显示,曼陀罗果实中的3种莨菪烷类生物碱总含量为11.73 mg/kg,大量食用曼陀罗果实会导致人严重中毒甚至死亡。两起中毒事件发生地位于云南省边境民族自治县市,曼陀罗中毒事件的发

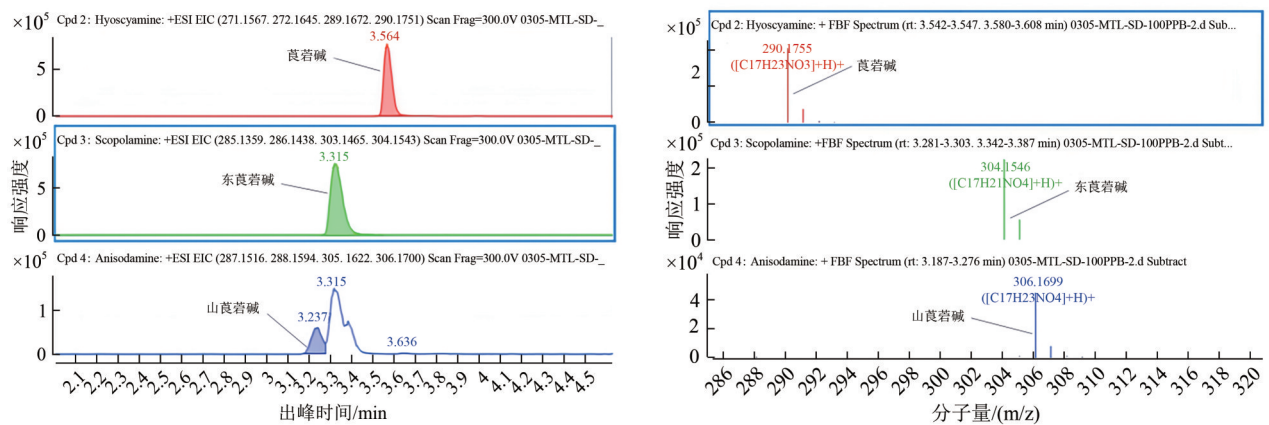


图1 标准离子流图和质谱图

Figure 1 Standard chromatogram and quality spectrum of standard

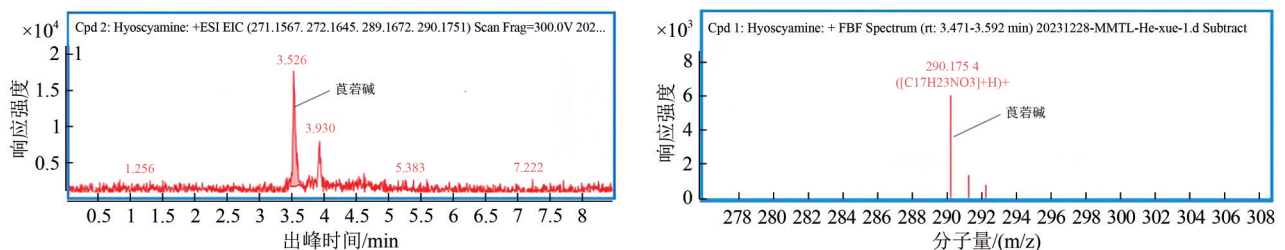


图2 何某血样离子流图和质谱图

Figure 2 Blood chromatogram and blood quality spectrum of patient He.

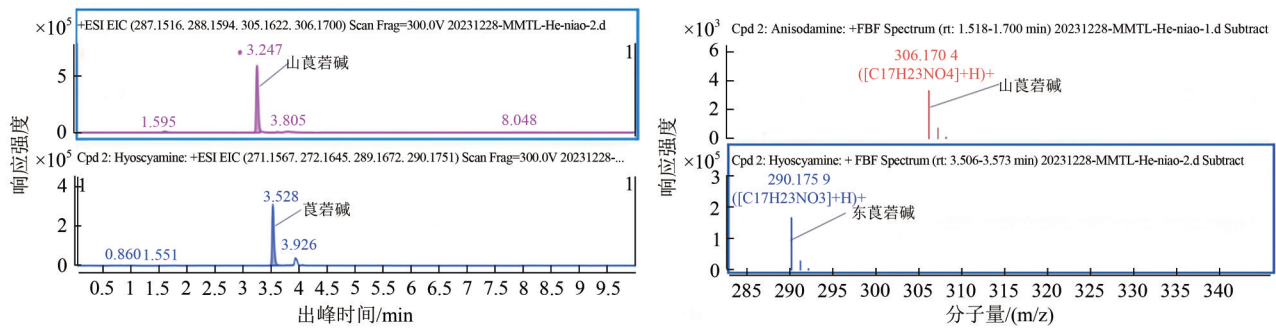


图3 何某尿样离子流图和质谱图

Figure 3 Urine chromatogram and quality spectrum of patient He.

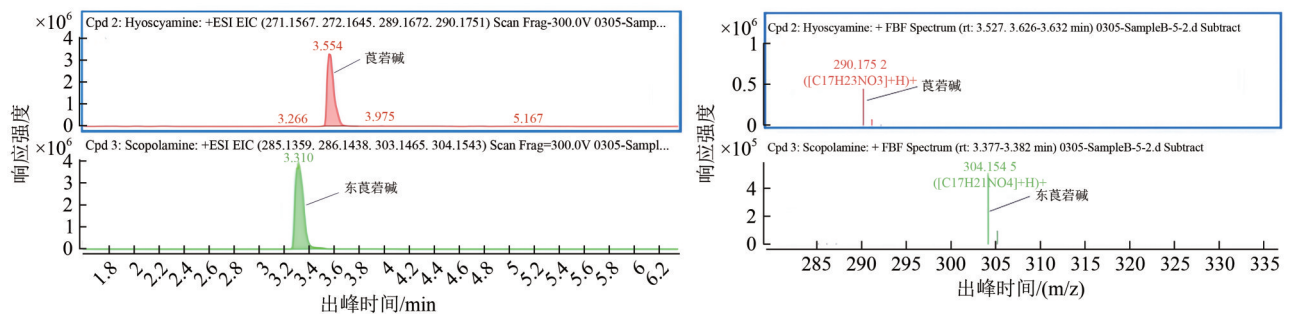


图4 食用剩余曼陀罗离子流图和质谱图

Figure 4 Chromatogram and quality spectrum of leftover food

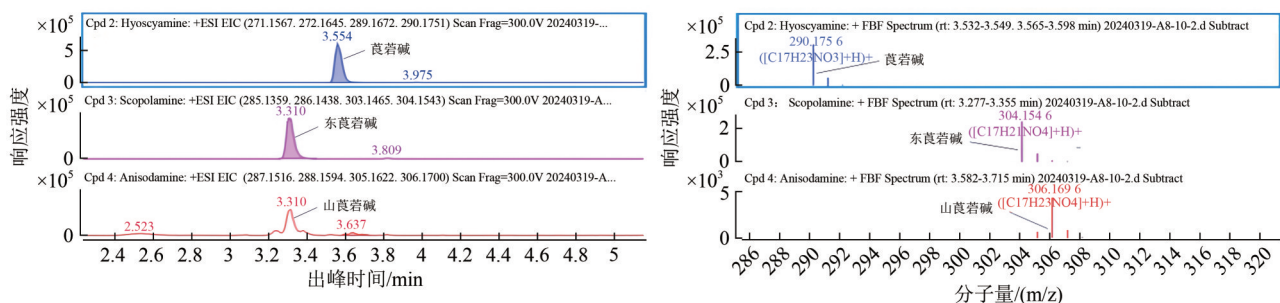


图5 泡酒离子流图和质谱图

Figure 5 Chromatogram and quality spectrum of the wine

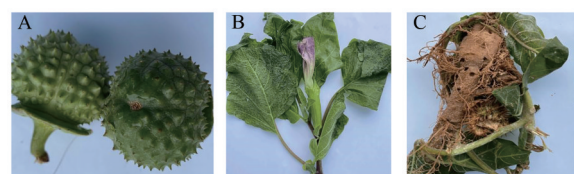
表4 曼陀罗各部分3种化合物的含量/(mg/kg)

Table 4 Content of 3 compounds in each part of *Datura stramonium* L/(mg/kg)

各部分	东莨菪碱	山莨菪碱	莨菪碱
根	ND	3.47	12.32
茎	2.37	0.78	0.78
叶	4.69	2.13	0.93
花	2.18	0.96	0.96
果实	2.72	5.32	3.69

注:ND表示未检出

生是否和当地特有的风俗习惯有关联还待进一步考察验证。曼陀罗等茄科植物是中国十分常见的有毒致幻植物,有毒化学物质成分复杂、毒性大,在投毒、误食和非法行医等均有致死的病例^[7-9]。此次实验室建立的曼陀罗有毒物质 UPLC/Q-TOF-MS 为查明患者中毒原因提供了技术支持。



注:A果实、B花茎叶、C根

图6 新鲜曼陀罗

Figure 6 Fresh *Datura stramonium* L.

参考文献

[1] 吕鸿鑫,何林,肖海清,等.一起家庭误食曼陀罗花引起中毒的案例调查[J].医学动物防制,2019,35(10):1016-1017. LYU H X, HE L, XIAO H Q, et al. A case study of poisoning caused by ingestion of *Datura* flowers in a family[J]. Prevention and Control of Medical Animals, 2019, 35(10): 1016-1017.

[2] 赵文艳,魏惠,景东华,等.以反应迟钝精神行为异常为首表现的曼陀罗中毒2例报告[J].中国实用神经疾病杂志,

- 2018, 21(6): 690-692.
- ZHAO W Y, WEI H, JING D H, et al. A report of two cases of Mandala poisoning with first manifestation of abnormal mental behavior [J]. Chinese Journal of Practical Neurological Diseases, 2018, 21(6): 690-692.
- [3] 徐宁, 冉俊祥, 杨占臣, 等. 曼陀罗毒性的研究进展[J]. 检验检疫学刊, 2009, 19(1): 62-65.
- XU N, RAN J X, YANG Z C, et al. Research progress on the toxicity of *Datura* [J]. Chinese Journal of Inspection and Quarantine, 2009, 19(1): 62-65.
- [4] 邓朝晖, 罗充, 刘彬, 等. 曼陀罗药用价值的开发和利用[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(7): 1394-1398.
- DENG C H, LUO C, LIU B, et al. Development and utilization of medicinal value on *Datura stramonium* L. [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(7): 1394-1398.
- [5] BHAKTA P G, LALITA S. A review on the pharmacological and toxicological aspects of *Datura stramonium* L. [J]. Journal of Integrative Medicine, 2013, 11(2): 73-79.
- [6] 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 Y H, MA M Y, et al. Identify the toxicological factors of a food poisoning caused by ingestion of *Datura stramonium* L. using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(2): 377-381.
- [7] 余彩蒙. 生物检材中莨菪烷类生物碱的超高效液相色谱-串联质谱检验方法研究[D]. 北京: 中国人民公安大学, 2017.
- SHE C M. Determination of scopolamine alkaloids in biological samples by ultra performance liquid chromatography mass spectrometry [D]. Beijing: People's Public Security University of China, 2017.
- [8] 陈静, 张凤, 张锐, 等. LC-MS/MS法测定毛曼陀罗中莨菪碱、东莨菪碱和山莨菪碱的含量[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2019, 40(4): 92-95.
- CHEN J, ZHANG F, ZHANG R, et al. Determination of the content of scopolamine, scopolamine and anisodamine in *Datura pilocarpa* by LC-MS/MS [J]. Journal of Jinggangshan University (Natural Science Edition), 2019, 40(4): 92-95.
- [9] LÁSZLÓ K, HAJNALKÁ H, IMRE L, et al. Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 beta-hydroxyhyoscyamine and apoatropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. Journal of chromatography. A, 2005, 1091(1/2): 32-39.