

实验技术与方法

液液萃取-气相色谱-质谱联用法同时测定曼陀罗中的
消旋山莨菪碱、东莨菪碱与(-)-莨菪碱秦国富¹,李恒新¹,李永波¹,沈讷敏¹,王芳²

(1. 西安市疾病预防控制中心,陕西 西安 710054;

2. 西安市长安区疾病预防控制中心,陕西 西安 710100)

摘要:目的 建立一种气相色谱-质谱联用法同时测定消旋山莨菪碱、东莨菪碱与(-)-莨菪碱的方法。方法 曼陀罗经 2 mol/L 盐酸超声提取 30 min 后过滤,滤液用浓氨水调节 pH \approx 9 后用三氯甲烷提取 3 次,挥干定容后上机测定。结果 消旋山莨菪碱、东莨菪碱与(-)-莨菪碱在 0.1~0.5 mg/ml 质量浓度范围内呈良好的线性关系,相关系数(r^2)为 0.998 1~0.999 5,在 0.2~0.4 mg/ml 两个浓度水平的加标回收率为 76.7%~119.0%,RSD 为 0.8%~7.3%,检出限为 0.1~1.0 μ g/kg。结论 本方法简单、快速、可靠,能够满足曼陀罗中消旋山莨菪碱、东莨菪碱与(-)-莨菪碱的检测分析。

关键词:液液萃取-气相色谱-质谱联用法;消旋山莨菪碱;东莨菪碱;(-)-莨菪碱;曼陀罗;生物碱

中图分类号:R927.2;O629.3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)04-0351-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.04.012

Determination of raceanisodamine, scopolamine and (-)-hyoscyamine in datura by LLE-GC-MS

QIN Guo-fu, LI Heng-xin, LI Yong-bo, SHEN Ne-min, WANG Fang

(Xi'an Center For Disease Control and Prevention, Shaan Xi Xi'an 710054, China)

Abstract: Objective A method for determination of raceanisodamine, scopolamine and (-)-hyoscyamine by LLE-GC-MS was established. **Methods** Datura was filtered after ultrasonic extraction with 2 mol/L hydrochloric acid for 30 min. The filtrate was extracted three times with chloroform after adjusting pH to 9 with concentrated aqueous ammonia. The extract was evaporated to dryness and diluted to constant volume before determination. **Results** There was a good linearity between the peak area and the concentration of raceanisodamine, scopolamine and (-)-hyoscyamine within the range of 0.1-0.5 mg/ml, the correlation coefficients were 0.998 1-0.999 5, the recoveries of spiked samples at 0.2 mg/ml and 0.4 mg/ml to flowers and leaves of datura were ranged from 76.7% to 119.0%, RSDs were ranged from 0.8% to 7.3%, and the detection limits were ranged from 0.1 to 1.0 μ g/kg. **Conclusion** The method was simple, rapid and reliable. It could be applied to determine raceanisodamine, scopolamine and (-)-hyoscyamine in datura.

Key words: Liquid-liquid extraction-gas chromatography-mass spectrometry; raceanisodamine; scopolamine; (-)-hyoscyamine; datura; alkaloid

曼陀罗又叫洋金花、山茄子等,原产自亚洲的热带及亚热带地区,我国各省均有分布^[1]。曼陀罗等茄科植物中含有莨菪碱(又名天仙子碱)、阿托品、东莨菪碱等生物碱,对人有剧毒,中毒多见于儿童误食曼陀罗、莨菪等植物的花果所致^[2]。曼陀罗幼苗与灰灰菜、人旱菜幼苗很相似,误采误食曼陀罗幼苗引起食物中毒的情况也有发生。曼

陀罗中毒的主要表现有口渴舌燥、发音嘶哑、颜面潮红、头晕恶心、呕吐、烦躁不安、语无伦次、瞳孔散大、视物模糊、抽搐痉挛等^[3]。曼陀罗中莨菪碱含量的测定方法有酸碱滴定法^[4]、反相离子对液相色谱法(GC-MS)^[5]、高效液相色谱法(HPLC)^[6]和气相色谱-质谱法(GC-MS)^[7]等。医药等行业基本都采用高效液相色谱法检测莨菪碱,但由于采用 HPLC 法测定消旋山莨菪碱、东莨菪碱和(-)-莨菪碱时灵敏度不高,故本研究对曼陀罗的叶子、花及果实用稀盐酸溶液超声提取,浓氨水调节至碱性后用三氯甲烷液液萃取,利用 GC-MS 进行测定。该法操作简单、灵敏度高、提取效果好,可快速、准确地测定曼陀罗中莨菪碱的含量。

收稿日期:2014-01-05

作者简介:秦国富 男 检验师 研究方向为食品卫生检验

E-mail: qinguofu123@126.com

通讯作者:李永波 女 高级工程师 研究方向为食品安全监测和

药物分析 E-mail: lyb981238@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

样品采自当地一株成年曼陀罗的叶子、花、果实,样品切碎或粉碎后充分混匀,待分析样品在提取生物碱前储存于4℃冰箱,留样保存于-20℃冰柜。

1.1.2 主要仪器与试剂

Agilent 7890A-5975C 气相色谱质谱联用仪(美国安捷伦)、TTL-DC II 氮吹仪(北京同泰公司)、超声清洗器、快速混匀器。

生物碱标准品:消旋山莨菪碱、(-)-莨菪碱、东莨菪碱,编号依次为 100249-200902、H674300、00019090,均购自美国 ChromaDex. Inc,浓氨水(分析纯),盐酸(优级纯),甲醇(色谱纯),三氯甲烷(色谱纯),定性滤纸。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

准确称取新鲜样品 1.00 g(干性样品 0.50 g),置于锥形瓶中,加入 2 mol/L 盐酸溶液 10 ml,超声处理 30 min,冷却、过滤,用 2 mol/L 盐酸溶液 10 ml 分 4 次洗涤滤渣和过滤器,合并滤液和洗液,用浓氨试剂调节 pH≈9,用三氯甲烷振荡提取 3 次,每次 10 ml,合并三氯甲烷并氮吹至近干,残渣用三氯甲烷溶解并定容,上机检测。

1.2.2 混合标样的制备

精密称取消旋山莨菪碱、(-)-莨菪碱、东莨菪碱标准品,用甲醇溶解,配制成各自浓度分别为 0.5、0.5、0.25 mg/ml 的标准储备液于 4℃冰箱中避光保存。将标准储备液分别稀释成浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml 的标准系列,用于工作曲线的测定。

1.2.3 仪器条件

气相色谱条件:采用 DB-1701 毛细管柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm),进样口温度 250℃,载气为氦气,恒流 1.0 ml/min。不分流进样,进样量 1 μl。升温程序:80℃保持 1 min,20℃/min 升至 220℃保持 1 min,10℃/min 升至 270℃保持 5 min。

离子监测扫描(SIM)质谱条件:离子化方式 EI, EI 源温度 230℃,接口温度 280℃,电子能量 70 eV,溶剂延迟 4 min。

2 结果与分析

2.1 提取方法及溶剂的选择

消旋山莨菪碱、东莨菪碱和(-)-莨菪碱是一类容易分解的生物碱,为了寻找最佳的样品处理方法,本研究在样品中加入一定量的混标溶液,分别采用直接

碱化法(以 pH≈9 的氨水碱化的去离子水超声提取)、酸化-碱化法(见 1.2.1)、三氯甲烷直接提取法进行提取。试验结果表明,提取多种生物碱,直接碱化法方法简单,但色谱检出的杂质峰较多,回收率相对较高;三氯甲烷直接提取法同样方法简单,但回收率和提取效率均相对较低;酸化-碱化法方法相对繁琐,但色谱峰杂质较少,回收率最好,因此本次试验选用酸化-碱化法提取曼陀罗中的生物碱。

2.2 萃取次数的选择

配制浓度分别为 0.2、0.4 mg/ml 的 6 对加标样品,分别用三氯甲烷进行 1~6 次萃取,每次充分振摇后吸取三氯甲烷,将每一步的萃取液分别上机测定其含量及回收率。由图 1 可知,两个浓度组中萃取的最佳次数均为 3 次。在试验中,考虑到合并多次提取液时浓缩、净化、定容等过多的操作会带来更大的试验误差、花费更多的时间,而且 95% 的萃取效率已基本能够满足测定需求,所以本研究选择萃取 3 次。

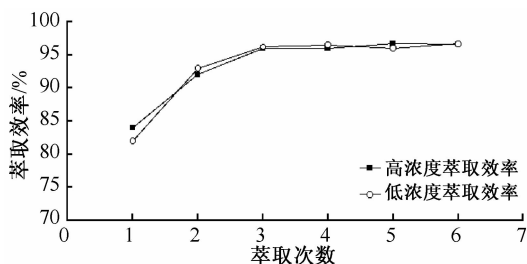


图 1 两种浓度萃取效率比较

Figure 1 Compare of two concentrations with extraction efficiency

2.3 线性范围及检出限

由消旋山莨菪碱、东莨菪碱和(-)-莨菪碱混合标准曲线得出回归方程、线性范围以及相关系数;分别以 3 倍信噪比和 10 倍信噪比计算检出限与定量限分别在 0.1~1.0 与 0.3~3.0 μg/kg 之间,详见表 1。该方法线性范围宽、灵敏度高,可以满足曼陀罗中消旋山莨菪碱、东莨菪碱和(-)-莨菪碱的分析要求。

表 1 3 种生物碱的线性方程、相关系数、检出限及定量限

Table 1 Regression equations, correlation, limits of detection and limits of quantification of 3 alkaloids

生物碱	检出限 / (μg/kg)	定量限 / (μg/kg)	线性方程	相关系数 r^2
(-)-莨菪碱	0.1	0.3	$y = 2e^{+06}x - 29184$	0.999 2
			$y = 1e^{+07}x - 773822$	0.999 5
			$y = 3e^{+08}x - 1e^{+07}$	0.999 5
东莨菪碱	0.1	0.3	$y = 3e^{+07}x - 2e^{+06}$	0.998 9
消旋山莨菪碱	1.0	3.0	$y = 8e^{+06}x - 434145$	0.998 7
			$y = 4e^{+07}x - 4e^{+06}$	0.998 1
			$y = 2e^{+07}x - 2e^{+06}$	0.999 2

注: (-)-莨菪碱、消旋山莨菪碱含有多个同分异构体,表中列出了不同同分异构体线性方程及相关系数

2.4 回收率与精密度

分别在新鲜的叶子与干性的花中加入高、低两个水平的生物碱混标,重复测定6次,进行加标试验以测定该方法的准确度。所得到的加标回收率与相对标准偏差(RSD)详见表2。

表2 3种生物碱的加标回收率和精密度($n=6$)
Table 2 Recoveries and relative standard deviations (RSD) at two spiked levels of 3 alkaloids

生物碱	添加量 /(mg/kg)	叶子		花	
		回收率 /%	RSD /%	回收率 /%	RSD /%
(-)-莨菪碱	400	78.8	3.3	93.3	5.3
	800	76.7	2.8	102.9	6.8
东莨菪碱	400	119.0	6.7	105.9	2.7
	800	107.4	0.8	96.1	4.5
消旋山莨菪碱	400	95.5	4.2	109.6	7.3
	800	101.9	1.7	88.2	4.9

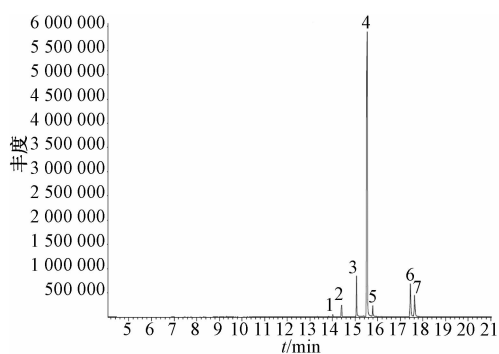
2.5 色谱条件的确定

对3种生物碱的单个标准品和混合标准物质分别进行GC-MS全扫描,通过将混合标准物质的总离子流图中各个色谱峰与各单个标准品色谱峰的保留时间及质谱图进行比对,结合仪器谱库中的标准谱图,确定3种生物碱的保留时间以及其在GC-MS选择离子扫描中的监测离子和采集时间。各组分及同分异构体的特征碎片监测离子和定量离子以及保留时间见表3,3种生物碱混合标准物质的GC-MS选择离子色谱图见图2。

表3 3种生物碱及同分异构体的保留时间和特征离子

Table 3 Retain time and characteristic ions of 3 alkaloids

化合物	保留时间 /min	定量离子 /(m/z)	定性离子 /(m/z)
(-)-莨菪碱 1	14.037	124	82,94
(-)-莨菪碱 2	14.409	124	82,94
东莨菪碱	15.079	192	177,149,69
(-)-莨菪碱 3	15.525	124	82,94
消旋山莨菪碱 1	15.794	94	95,140
消旋山莨菪碱 2	17.482	94	95,140
消旋山莨菪碱 3	17.648	94	95,140



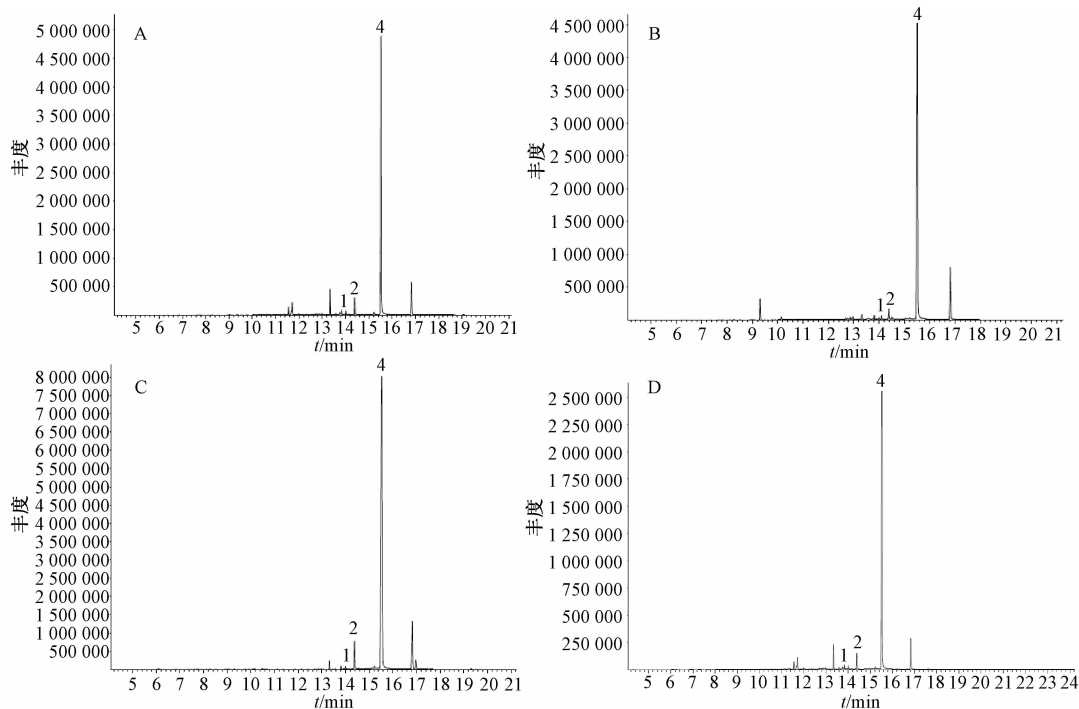
注:1、2、4为(-)-莨菪碱;3为东莨菪碱;5、6、7为消旋山莨菪碱

图2 生物碱混合标准物质色谱图

Figure 2 Selective ion chromatogram of 3 alkaloids

2.6 样品的检测

分别对当地一株成年曼陀罗的叶子、花和果实进行检测,总离子流图见图3,在曼陀罗的三个部位



注:A. 干叶子;B. 花;C. 果实;D. 湿叶子;1.2.4为(-)-莨菪碱

图3 样品色谱图

Figure 3 Ion chromatogram of samples

均检出了(-)-莨菪碱,但均未检出东莨菪碱与消旋山莨菪碱。样品叶子(湿)、叶子(干)、花(干)和果实(干)中(-)-莨菪碱浓度分别为660.86、2 676.62、1 334.28和2 763.62 mg/kg。

3 小结

本研究采用液液萃取-气相色谱-质谱联用法分析测定曼陀罗中3种生物碱,试验结果表明曼陀罗中(-)-莨菪碱含量由高到低依次为果实、叶子和花。对于实际样品分析,该方法操作简单、灵敏度高、提取效果好,从而实现了快速、准确测定曼陀罗中莨菪碱的含量。

实验技术与方法

高效液相色谱法同时测定面粉及面粉改良剂中的曲酸和噻二唑

简龙海,钟吉强,王欣美,郑荣,刘畅,王柯
(上海市食品药品检验所,上海 201203)

摘要:目的 建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定面粉及面粉改良剂中的曲酸和噻二唑。方法 色谱柱 Atlantis C₁₈(4.6 mm × 15 cm, 5 μm),流动相组成为乙腈-0.1%磷酸溶液,梯度洗脱,流速1.0 ml/min,进样体积1 μl,曲酸和噻二唑的检测波长分别为269和300 nm。样品以乙腈提取,提取液经离心、滤过后供HPLC分析。结果 曲酸、噻二唑均在0.5~20 μg/ml范围内线性关系良好,平均加标回收率为84.2%~92.4%,RSD为1.1%~6.9%(n=6),检出限(LOD)分别为2.0和0.7 mg/kg。结论 该方法可用于面粉和面粉改良剂中曲酸和噻二唑的测定。

关键词:曲酸;噻二唑;面粉;面粉改良剂;高效液相色谱法

中图分类号:R155.52;TS201.6 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)04-0354-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.04.013

Simultaneous determination of kojic acid and 2-mercapto-5-methyl-1, 3, 4-thiadiazole in flour and flour improver

JIAN Long-hai, ZHONG Ji-qiang, WANG Xin-mei, ZHENG Rong, LIU Chang, WANG Ke
(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of kojic acid and 2-mercapto-5-methyl-1, 3, 4-thiadiazole (MMTD) in flour and flour improver by HPLC. **Methods** Separation was achieved on an Atlantis C₁₈ column (4.6 mm × 15 cm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution. Gradient elution was used with the flow rate of 1.0 ml/min. The injection volume was 1 μl and the detection wavelength was 269 nm for kojic acid and 300 nm for MMTD. Kojic acid and MMTD in samples were extracted by acetonitrile. After centrifugation and filtering, sample solutions were analyzed by HPLC. **Results** Kojic acid and MMTD both showed good linearity in the range of 0.5-20 μg/ml. The average recoveries were in the range of 84.2%-92.4% (RSD 1.1%-6.9%, n=6). Limit of detection (LOD) of kojic acid and MMTD were 2.0 and 0.7 mg/kg, respectively. **Conclusion** The method can be used

收稿日期:2013-09-27

作者简介:简龙海 男 主管药师 研究方向为食品、药品、化妆品分析 E-mail:jianjlh@hotmail.com

通讯作者:王柯 男 主任药师 研究方向为食品、药品、化妆品分析 E-mail:wksifdc@163.com

参考文献

- [1] 孙亚飞,徐海娇.植物之美[M].吉林:吉林出版集团有限责任公司,2010:82-83.
- [2] 杨玉林,温忆敏,芮振荣,等.气相色谱-质谱联用技术分析毒样品中四种生物碱[J].中国卫生检验杂志,2004,14(3):272-273.
- [3] 邢慧敏,耿振新,刘静,等.一起有曼陀罗引起食物中毒的调查分析[J].职业与健康,2001,17(9):52.
- [4] 中华人民共和国卫生部药典委员会编.中华人民共和国药典(一部)[M].1版.北京:化学工业出版社,2000:219.
- [5] 于霖江,杨德柱,胡淑贤.反相高效液相色谱法测定洋金花中东莨菪碱的含量[J].中成药,1992,14(8):35.
- [6] 何执静,何执宁,王金凤.高效液相色谱法测定洋金花药材中东莨菪碱的含量[J].药物分析杂志,1999,19(3):174-176.
- [7] 褚建新,谢瑜,卓晓聪.东莨菪碱的GC/MS检验[J].法医学杂志,2006,22(4):285-287.