

论著

72 种生物碱高分辨质谱数据库建立与应用

唐晓琴,赵舰,贺丽迎,甘源,周春艳,程莉,覃梅
(重庆市疾病预防控制中心,重庆 400042)

摘要:**目的** 建立常见生物碱的高分辨质谱数据库并应用于中毒样品的自动筛查。**方法** 将生物碱标准品溶液以流动注射方式直接导入四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪,或经高效液相色谱分离后进行质谱分析,得到准分子离子峰的精确质量数和合适的碰撞能量,采用 HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm),以甲醇和 5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液为流动相,梯度洗脱,电喷雾电离源正离子模式(HESI⁺)和 tSIM-ddMS² 模式下分析,采集生物碱的二级质谱信息,并将此质谱数据用于实际样品的自动筛查。**结果** 获得了 72 种生物碱的精确分子量、保留时间、碰撞能量、碎片离子等信息并建立了质谱库,通过 Full mass 模式进样,仪器自动检索可快速锁定实际样品中含有的多种生物碱。**结论** 该方法操作简便、灵敏度高,可满足中毒样品中生物碱快速自动筛查的要求。

关键词: 高分辨质谱;生物碱;自动筛查;质谱数据库

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004- 8456(2020)03- 0228- 06

DOI:10. 13590/j. cjfh. 2020. 03. 002

Establishment and application of 72 alkaloids database with high resolution mass spectrometry

TANG Xiaoqin, ZHAO Jian, HE Liying, GAN Yuan, ZHOU Chunyan, CHENG Li, QIN Mei
(Chongqing Center for Disease Control and Prevention, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective The high resolution mass spectra database of common alkaloids were established and applied to the automatic screening of poisoning samples. **Methods** The accurate molecular mass and appropriate collision energy of each alkaloid was obtained by injecting alkaloid standard solutions into the Q exactive mass spectrometry directly or separated by high performance liquid chromatography and mass spectrometry analysis. The chromatographic analysis was performed on a HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) by gradient elution using methanol and 5 mmol/L ammonium acetate containing 0.1% formic acid solution as mobile phase. The secondary mass information of alkaloid was collected in positive electrospray ionization and targeted-selected ion monitor-ddMS² mode. The mass spectrometry data were applied to the automatic screening of actual samples. **Results** The mass spectrometry database of 72 alkaloids were established containing the theoretical accurate molecular mass, retention time collision energy and fragment ions. The multiple alkaloids in actual samples were locked rapidly by automatic screening with the mass spectra database. **Conclusion** This method is simple, fast, accurate and suitable for the rapid automatic screening of alkaloids in poisoned food sample.

Key words: High-resolution mass spectrometry; alkaloids; automatic screening; mass spectra database

生物碱(alkaloids)一般指存在于生物体内的碱性含氮化合物,多数具有复杂的含氮杂环,有光学活性和明显的生理效应^[1],具有抗癌、强心、镇痛、降血压、抗菌消炎等功效^[2]。民间常作为药物的动

植物中含有生物碱,或制成药酒、汤药作为“滋补品”口服,其往往存在有毒成分,且治疗量与中毒量接近,用药不当、盲目和超量服用,容易造成中毒和死亡;因此,建立快速、灵敏、可靠的生物碱筛查方法具有重要意义。

生物碱的检测方法主要有高效液相色谱(HPLC)法^[3-6]、气相色谱-质谱联用(GC-MS)法^[7-9]和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法^[10-13]。HPLC 法检出限较高,且只凭保留时间定性,易出现假阳性。GC-MS 法分析有毒生物碱则需要衍生化,操作过程较复杂。HPLC-MS/MS 法虽具有高选择性、高

收稿日期:2020-03-26
基金项目:重庆市卫生健康委员会重点课题:运用高分辨质谱技术建立常见生物碱数据库及生物碱中毒检测方法研究(2017ZDXM002)
作者简介:唐晓琴 女 副主任技师 研究方向为食品安全检测技术及食物中毒检测技术 E-mail: 898757@qq.com
通信作者:赵舰 男 主任技师 研究方向为食品安全检测技术及食物中毒检测技术 E-mail:414535058@qq.com

灵敏度的优点,但需以标准品优化好质谱参数后方可进行分析,且在高通量分析上有一定劣势。高分辨质谱仪可在超高分辨率下测定化合物精确分子量,可以区分复杂背景中的杂质及共流出物,降低了对样品前处理的要求。在全扫描模式下,无需对各化合物的质谱参数分别进行优化,因此能实现对高通量的目标物或非目标物筛选,并可以在缺乏标准品的情况下,以提取离子流图结合同位素分布信息等锁定可疑化合物,生成的数据具有可回顾性^[14]。在二级质谱模式下,由样品与标准品之间碎片离子精确分子量的比对可大大提高定性的准确性,使得在无标准品的情况下,定性结果也具有一定的可信度;因此,高分辨质谱用于未知物的快速筛查分析已成为一种趋势。

本研究建立了利用高分辨质谱对生物碱进行自动筛查的数据库,并以易含有毒生物碱的样品如药酒、发芽马铃薯、野菜等为对象,基于该数据库的建立,考察了运用该数据库进行筛选和确证的能力。随机数据库包含几百种农药残留及兽药残留,目前国内外研究也多集中于此,对生物碱的研究则少有涉及^[15-19]。本研究首次采用高分辨质谱技术系统构建 72 种生物碱的一级和二级质谱参数,并经过实际中毒样品的验证,具有较高的创新和应用价值,为各类因生物碱中毒案例提供快速、精准确证的科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Thermo Scientific Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱系统、Dionex UltiMate 3000 快速高效液相色谱系统均购自美国赛默飞,Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore)。

72 种生物碱标准品主要购自美国 ChromaDex、美国 Cerilliant、加拿大 TRC、伊普赛诺科技(天津)有限公司;甲醇、甲酸、乙酸铵均为色谱纯,试验用水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

生物碱标准品以甲醇等适合溶剂超声溶解后,配制成浓度为 1 000 mg/L 的标准储备溶液,分析时以甲醇逐级稀释至 200 μg/L。

1.2.2 样品分析

取泡制酒、中药饮料样品 0.1 mL,以纯水稀释定容至 10.0 mL,过 0.22 μm 有机系滤膜上机分析。称取发芽马铃薯、野菜样品约 5 g,以 20 mL 甲醇匀浆提取后,5 000 r/min 离心 5 min(离心半径 10 cm),取上

清液过 0.22 μm 有机系滤膜上机分析。

1.2.3 仪器条件

色谱:Waters HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);流速 0.25 mL/min;柱温 40 ℃;流动相:A 为 5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液,B 为甲醇。梯度洗脱:0~15 min,10%~90% B;15~18 min,90%~100% B;18~18.1 min,100%~10% B;18.1~20 min,10% B。

质谱:电喷雾电离源正离子模式 HESI⁺;喷雾电压:3.50 kV;毛细管温度:350 ℃;加热器温度:350 ℃;鞘气:45 arb,辅助气:11 arb。扫描模式 1:Full mass,扫描范围:150~900,正离子模式;分辨率:70 000。扫描模式 2:tSIM-ddMS²,正离子模式,SIM 分辨率:70 000,ddMS² 分辨率:35 000。

1.2.4 质谱数据的预收集

在 Full mass 模式下,参考目标化合物的精确分子量,取浓度为 200 μg/L 的各生物碱标准溶液,利用流动注射进样获取[M+H]⁺准分子离子质谱峰。并以[M+H]⁺准分子离子为母离子,在全离子碎裂(AIF)-MS/MS 模式下,选择合适的碰撞能量,得到化合物二级质谱信息。一般以在保留准分子离子峰的情况下,有 2~3 个丰度较高的碎片离子峰为宜。

1.2.5 保留时间及完整质谱数据的采集

取浓度为 200 μg/L 的各生物碱标准溶液,在 tSIM-ddMS² 模式下,固定 LC 条件进样分析。在一级质谱模式下,手动提取[M+H]⁺准分子离子流图,可获得目标化合物保留时间信息。在此保留时间下,选择二级质谱图可得到目标化合物的二级质谱信息。将精确分子量、保留时间、二级质谱信息、CAS、分子式、碰撞能量等信息添加入谱库中,建立目标化合物的完整谱库。

2 结果与分析

2.1 构建生物碱谱库数据

根据文献报道及实际工作之所见,常见的有毒生物碱一般包括乌头碱类、雷公藤类、茄碱类、东莨菪碱类等。乌头碱类为萜类生物碱,其氮原子在萜的环状结构中或在萜结构的侧链上,民间常用草乌、川乌、雪上一枝蒿等乌头属植物泡制药酒服用而中毒。雷公藤类主要活性成分亦为萜类,常因食用被雷公藤污染的蜂蜜导致中毒。茄碱为一种甾体类生物碱,其氮原子在甾环中,以与低聚糖结合的形式存在,一般因食用发芽土豆造成中毒。东莨菪碱为莨菪烷衍生物,常因误食形似秋葵的曼陀罗或野菜而引起中毒^[20]。本研究选取了以上几类多发中毒事件的生物碱共 72 种建立了生物碱谱库数

据。根据欧盟 SANTE/11813/2017 标准^[21]要求,残留分析结果的高分辨质谱确证要求质量数相对偏差的绝对值不超过 5×10^{-6} Da,即 5 ppm。表 1 列出了所建立的 72 种生物碱质谱数据库主要信息,可见

在 200 μg/L 浓度水平下,测定的准分子离子精确质量数与理论值的偏差情况均小于 5 ppm。部分化合物如雪上一枝蒿甲素等由于分子结构的原因,只能得到一个丰度较高的碎片离子。

表 1 72 种生物碱谱库数据
Table 1 Mass spectra database of 72 alkaloids

化合物	CAS	分子式	理论分子量 [M+H] ⁺	实测分子量 [M+H] ⁺	保留时间/min	碰撞能量	子离子 1	子离子 2	质量数相对偏差/ppm
槟榔碱	63-75-2	C ₈ H ₁₃ NO ₂	156.101 9	156.102 0	1.35	65	81.034 2	113.060 2	0.70
八角枫碱	494-52-0	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	163.123 0	163.123 0	1.68	55	118.065 4	146.096 4	0.43
麻黄碱	299-42-3	C ₁₀ H ₁₅ NO	166.122 6	166.122 7	5.20	10	148.111 9	—	0.18
伪麻黄碱	90-82-4	C ₁₀ H ₁₅ NO	166.122 6	166.122 8	5.37	10	148.112 1	149.115 4	0.96
芦竹碱	87-52-5	C ₁₁ H ₁₄ N ₂	175.123 0	175.123 0	5.34	10	130.065 1	—	0.11
茶碱	58-55-9	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	181.072 0	181.072 0	6.07	60	124.050 5	96.055 6	-0.28
可可碱	83-67-0	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	181.072 0	181.071 9	5.16	70	108.055 6	138.066 2	-0.50
东莨菪内酯	92-61-5	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.049 5	193.049 5	8.10	50	133.028 4	178.026 1	-0.36
毛果芸香碱	92-13-7	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂	209.128 5	209.128 3	3.66	60	163.123 0	95.060 4	-0.81
哈尔碱	442-51-3	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O	213.102 2	213.102 0	7.08	60	198.078 6	170.083 8	-0.89
石杉碱甲	102518-79-6	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O	243.149 2	243.149 0	6.15	65	210.091 3	226.122 6	-0.95
黄华碱	486-90-8	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	245.164 8	245.164 8	1.61	53	98.096 7	—	0.00
槐定碱	6882-68-4	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	249.196 1	249.195 8	4.37	90	84.080 8	120.080 8	-1.52
苦参碱	519-02-8	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	249.196 1	249.195 9	3.99	90	148.112 1	110.096 4	-0.80
二羟丙茶碱	479-18-5	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₄	255.108 8	255.108 7	6.13	52	181.072 0	124.050 5	-0.47
氧化苦参碱	16837-52-8	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	265.191 0	265.191 0	4.80	60	208.133 5	247.180 5	-0.04
后马托品	87-00-3	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	276.159 4	276.159 1	5.70	50	124.112 1	142.122 6	-1.30
毒扁豆碱	57-47-6	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₂	276.170 6	276.170 2	6.35	10	219.112 8	162.091 3	-1.52
胡椒碱	94-62-2	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286.143 8	286.143 5	12.78	35	201.054 6	135.044 1	-0.98
吗啡	57-27-2	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286.143 8	286.143 4	12.77	65	165.069 9	155.085 5	-1.29
吴茱萸次碱	84-26-4	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	288.113 1	288.113 2	9.57	66	273.089 7	169.076 2	0.07
加兰他敏	357-70-0	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	288.159 4	288.159 0	4.63	35	213.091 0	231.101 6	-1.46
阿托品	51-55-8	C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	290.175 1	290.174 5	6.68	50	124.112 1	93.069 9	-1.96
可待因	76-57-3	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	300.159 4	300.159 2	5.25	60	165.070 0	199.075 4	-0.60
吴茱萸碱	518-17-2	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O	304.144 4	304.144 5	7.59	27	134.060 1	161.071 0	0.20
东莨菪碱	51-34-3	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	304.154 3	304.154 0	5.69	30	138.091 3	156.101 9	-1.02
可卡因	50-36-2	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	304.154 3	304.154 0	7.56	30	182.117 6	—	-0.92
山莨菪碱	55869-99-3	C ₁₇ H ₂₃ NO ₄	306.170 0	306.170 0	5.95	44	140.106 8	122.096 6	-0.10
钩吻素子	1358-76-5	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O	307.180 5	307.180 7	6.42	63	180.080 8	220.112 0	0.55
蒂巴因	115-37-7	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	312.159 4	312.159 0	7.21	15	58.065 1	249.091 0	-1.25
氧可酮	76-42-6	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	316.154 3	316.154 2	5.59	33	298.146 4	256.133 1	-0.38
甲溴东莨菪碱	155-41-9	C ₁₈ H ₂₄ BrNO ₄	318.170 0	318.169 5	5.89	55	152.107 0	—	-1.54
钩吻碱	509-15-9	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	323.175 4	323.175 1	6.22	50	236.106 7	70.065 1	-0.90
马来酸麦角新碱	129-51-1	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₆	326.186 3	326.186 0	6.03	40	223.123 0	208.075 7	-0.80
青藤碱	115-53-7	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	330.170 0	330.169 6	5.58	50	181.064 8	239.070 3	-1.00
血根碱	5578-73-4	C ₂₀ H ₁₃ NO ₄	332.091 7	332.091 6	7.34	53	274.086 2	304.096 7	-0.45
士的宁	57-24-9	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	335.175 4	335.175 0	6.51	70	184.075 7	156.080 8	-1.13
小檗碱	2086-83-1	C ₂₀ H ₁₇ NO ₄	336.123 0	336.122 9	7.29	43	292.096 7	320.096 1	-0.42
药根碱	3621-817-3	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	339.138 7	339.138 6	8.44	40	323.115 2	294.112 5	-0.12
山梗菜碱	90-69-7	C ₂₂ H ₂₇ NO ₂	338.211 5	338.211 2	8.84	35	216.138 3	200.143 4	-0.65
罂粟碱	58-74-2	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	340.154 3	340.154 2	6.98	43	202.086 1	324.122 9	-0.26
雪上一枝蒿甲素	1354-84-3	C ₂₂ H ₃₃ NO ₂	344.258 4	344.258 1	5.90	70	58.065 1	—	-1.02
白屈菜红碱	34316-15-9	C ₂₁ H ₁₇ NO ₄	348.123 0	348.123 0	7.56	38	332.091 6	304.096 8	-0.20
喜树碱	7689-3-4	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₄	349.118 3	349.118 3	10.65	40	305.128 4	249.102 2	0.03
巴马汀	3486-67-7	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	352.154 3	352.153 7	8.84	43	336.123 0	308.128 1	-1.82
倒千里光碱	480-54-6	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352.175 5	352.175 5	6.00	46	120.081 0	138.091 3	0.06
原阿片碱	130-86-9	C ₂₀ H ₁₉ NO ₅	354.133 6	354.133 2	7.88	42	189.078 4	149.059 7	-1.10
DL-延胡索乙素	2934-97-6	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.185 6	356.185 3	7.99	35	192.101 9	165.091 0	-0.93
丁溴东莨菪碱	149-64-4	C ₂₁ H ₃₀ BrNO ₄	360.216 9	360.216 4	7.99	40	138.091 3	194.153 9	-1.39
雷公藤甲素	38748-32-2	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	361.164 6	361.163 7	9.72	47	105.069 9	119.085 5	-2.30

表 1(续)									
化合物	CAS	分子式	理论分子量 [M+H] ⁺	实测分子量 [M+H] ⁺	保留时间/min	碰撞 能量	子离子 1	子离子 2	质量数相对 偏差/ppm
10-羟基喜树碱	19685-09-7	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	365. 113 2	365. 113 2	7. 91	35	321. 122 3	265. 097 1	-0. 11
脱碳秋水仙碱	477-30-5	C ₂₁ H ₂₅ NO ₅	372. 180 6	372. 180 5	6. 92	32	310. 120 8	340. 154 3	-0. 03
马钱子碱	357-57-3	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	395. 196 5	395. 196 7	6. 31	50	244. 096 9	324. 123 0	0. 33
秋水仙碱	64-86-8	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	400. 175 5	400. 175 6	7. 91	32	310. 120 3	282. 125 1	0. 27
那可汀	128-62-1	C ₂₂ H ₂₃ NO ₇	414. 154 7	414. 154 5	8. 23	30	220. 096 8	353. 102 0	-0. 46
鬼臼毒素	518-28-5	C ₂₂ H ₂₂ O ₈	415. 138 7	415. 139 0	8. 31	10	397. 128 2	247. 060 1	0. 58
雪上一枝蒿乙素	466-26-2	C ₂₄ H ₃₉ NO ₆	438. 285 0	438. 285 1	6. 33	45	420. 274 5	388. 248 2	0. 27
雷公藤红素	34157-83-0	C ₂₉ H ₃₈ O ₄	451. 284 3	451. 283 9	15. 63	15	201. 091 0	405. 278 8	-0. 78
去甲泽拉木醛	107316-88-1	C ₂₉ H ₃₆ O ₆	481. 258 5	481. 258 8	14. 89	30	231. 065 2	203. 179 4	0. 79
吐根碱	316-42-7	C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₄	481. 306 1	481. 306 1	5. 90	36	246. 144 8	274. 180 0	0. 02
高三尖杉酯碱	26833-87-4	C ₂₉ H ₃₉ NO ₉	546. 269 8	546. 269 8	7. 92	30	298. 143 8	266. 117 6	0. 15
利血平	50-55-5	C ₃₃ H ₄₀ N ₂ O ₉	609. 280 7	609. 280 2	10. 62	31	195. 065 2	174. 091 3	-0. 84
筒箭毒碱	6989-98-6	C ₃₇ H ₄₀ N ₂ O ₆	609. 295 9	609. 295 2	5. 96	40	386. 175 1	564. 238 1	-1. 21
次乌头碱	6900-87-4	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀	616. 311 6	616. 311 9	7. 86	30	556. 291 0	524. 264 8	0. 44
粉防己碱	518-34-3	C ₃₈ H ₄₂ N ₂ O ₆	623. 311 6	623. 310 6	7. 88	38	381. 180 9	174. 091 3	-1. 52
新乌头碱	2752-64-9	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	632. 306 5	632. 306 2	9. 84	35	572. 285 4	354. 170 0	-0. 62
草乌甲素	79592-91-9	C ₃₅ H ₄₉ NO ₁₀	644. 342 9	644. 342 9	7. 96	29	584. 322 0	552. 295 8	-0. 03
乌头碱	206-121-7	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₁	646. 322 2	646. 321 7	10. 13	35	586. 301 1	526. 279 9	-0. 82
α-卡茄碱	20562-03-2	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₄	852. 510 4	852. 509 3	7. 94	20	398. 339 7	560. 391 9	-1. 27
雷公藤吉碱	37239-47-7	C ₄₁ H ₄₇ NO ₁₉	858. 281 5	858. 280 2	8. 97	17	206. 081 3	686. 244 0	-1. 50
雷公藤次碱	11088-09-8	C ₄₃ H ₄₉ NO ₁₈	868. 302 2	868. 301 4	9. 24	17	206. 081 3	850. 288 5	-0. 91
α-茄碱	20562-02-1	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₅	868. 505 3	868. 504 3	7. 74	55	98. 096 6	398. 341 2	-1. 19

注:—为无子离子 2

表 1 中各生物碱实测分子量、保留时间为建库时采集得到。实际检测中发现,分子量数据较为稳定,不论是标准溶液、加标模拟样品还是实际样品,与理论值的偏差均小于 5 ppm,基质干扰较小,符合欧盟要求。但保留时间偏差则较大,每次更换流动相后标准溶液保留时间存在 0. 1~0. 3 min 的波动,数月后该偏差可能会放大至 1~3 min。故在实际筛查中保留时间仅作为参考,设置筛查条件时以分子量作为标尺。当以 Full mass 模式扫描后,通过精确分子量初步筛查出可疑生物碱后,会同时进相应的标准溶液作为对照,此时采用 tSIM-ddMS² 模式进行扫描,再以标准溶液的保留时间及二级质谱数据辅助定性。建库时为得到可靠的二级质谱数据,进样浓度较大,达到 200 μg/L,在后续试验中发现,各生物碱标准溶液在 5 μg/L 的浓度时依然有良好的响应,按药酒样品稀释 100 倍估算,生物碱定性筛查的检测限≤0. 5 mg/L,完全可以满足中毒样品的定量筛查需要。

2.2 质谱库的应用

为了考察所建谱库对实际样品的筛选能力,以两起中毒事件为例。2018 年 5 月重庆市璧山区发生的居民自制药酒中毒,经 HPLC 分离,在 Full mass 模式下进行质谱分析,并使用所建谱库对样品数据进行自动检索,筛查出雪上一枝蒿甲素、雪上一枝蒿乙素、乌头碱等,部分检索结果见表 2。分析检索结果中质量数相对偏差、测量化合物峰面积和信噪

比等参数,其中雪上一枝蒿甲素峰面积最大,并结合临床表现,初步判定为雪上一枝蒿甲素中毒。同时,配制 100 μg/L 的雪上一枝蒿甲素标准品以相同条件进样分析,所得目标化合物保留时间一致,标准品与送检样品一级质谱精确分子量偏差小于 5 ppm(见图 1),进一步对自建生物碱谱库的筛查结果进行了确证,符合筛查结果。

表 2 重庆市璧山区自制药酒样品筛查比对结果
Table 2 Screening and comparison results of self-made medicinal wine in Bishan District, Chongqing

化合物	理论分子 量/Da	实测分子 量/Da	质量数相对 偏差/ppm	保留时间 /min
雪上一枝蒿甲素	344. 258 4	344. 257 5	-2. 71	6. 86
雪上一枝蒿乙素	438. 285 0	438. 284 2	-1. 89	6. 69
乌头碱	646. 322 2	646. 322 4	0. 30	8. 62

2019 年 5 月重庆市沙坪坝区发生居民自采野菜食用中毒,运用该谱库对中毒现场采集的野菜叶进行筛查鉴定,峰面积最大的 3 种生物碱检索结果见表 3,可见该样品主要含有东莨菪碱,并以标准品进行确证(见图 1),符合筛查结果。

一些食品因储存不当而引起中毒,如发芽马铃薯,易产生 α-卡茄碱等生物碱,误食后轻则导致恶心呕吐,重则危及生命,本研究也运用该谱库对发芽马铃薯样品进行筛查,检索结果显示含有 α-卡茄碱及龙葵素,见表 4,并以标准品进行确证(见图 1),符合筛查结果。

从上述实例验证看,本研究建立的以精确质量数

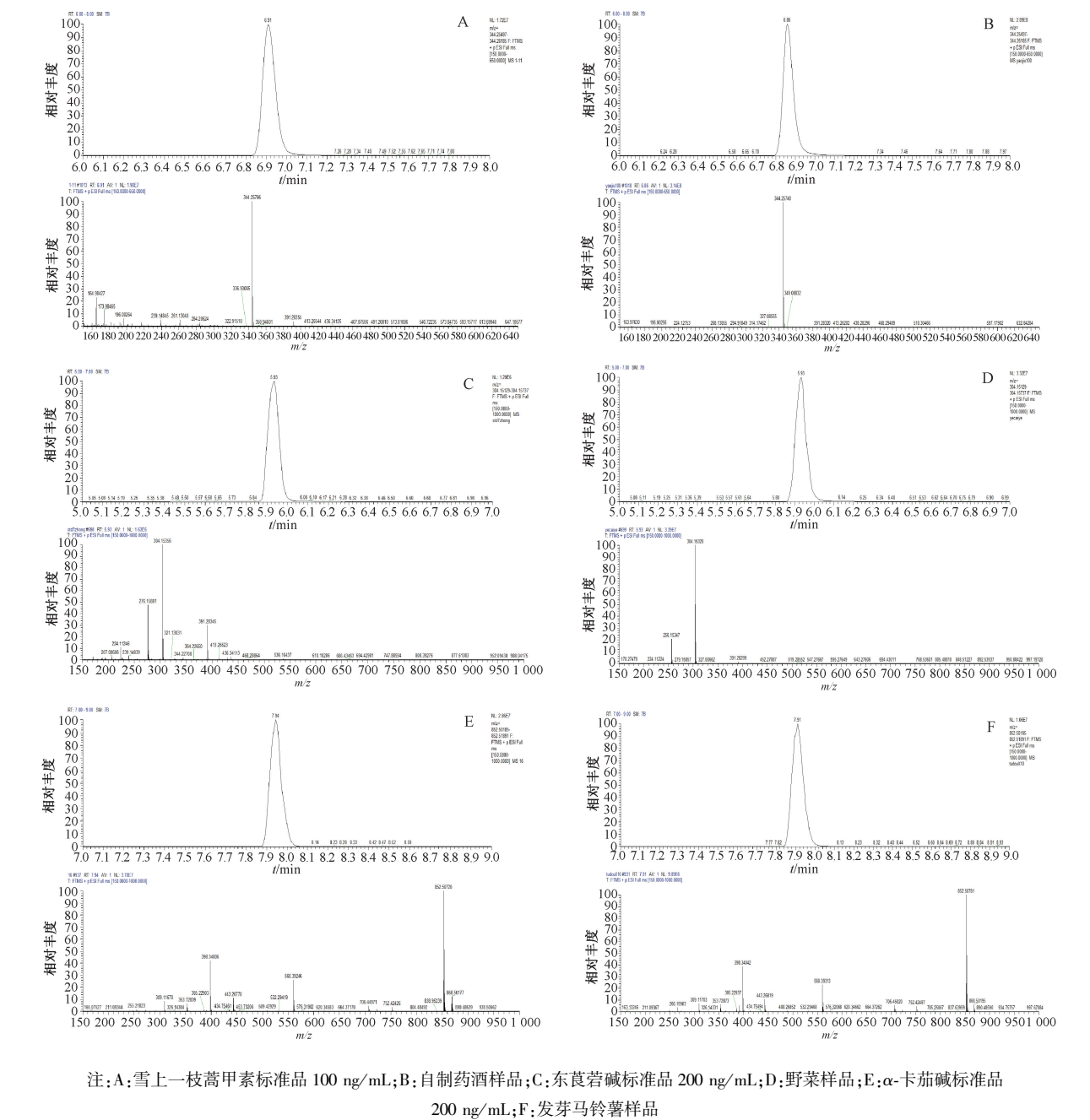


图 1 标准品与样品中目标化合物提取离子流图与一级质谱图

Figure 1 Extracted ion chromatograms and mass spectra of target compounds in standards and samples

表 3 重庆市沙坪坝区自采野菜样品筛查比对结果				
Table 3 Screening and comparison results of wild vegetables in Shapingba District, Chongqing				
化合物	理论分子 量/Da	实测分子 量/Da	质量数相对 偏差/ppm	保留时间 /min
东莨菪碱	304.154 3	304.153 2	-3.72	5.93
阿托品	290.175 1	290.174 2	-3.02	6.51
山莨菪碱	306.170 0	306.168 9	-3.57	6.16

表 4 发芽马铃薯样品筛查比对结果

Table 4 Screening and comparison results of sprouting potato				
化合物	理论分子 量/Da	实测分子 量/Da	质量数相对 偏差/ppm	保留时间 /min
α-卡茄碱	852.510 4	852.507 8	-3.01	7.91
龙葵素	868.505 3	868.501 8	-3.99	7.92

和碰撞能量为主要参数的生物碱质谱筛查技术具有可行性,对于保留时间的使用仅可作为参考,因为随着测试条件发生变化,不同基质、不同仪器,都有可能影响保留时间的变化。在鉴别同分异构体的生物碱时应使用二级质谱。后续研究工作将对生物标本如血、尿、头发、体液中生物碱进行检测以及对生物碱在体内进行代谢后的产物进行筛查鉴定。

3 小结

本研究利用 HPLC 与四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪优化得到 72 种生物碱的精确分子量、保留时间、碰撞能量、碎片离子等信息,建立了常见生物碱

自动筛查数据库。使用该数据库,可快速地对各类中毒样品中含有的常见生物碱进行筛查,解决了没有标准品不能定性的难题,且定性结果准确可靠。

参考文献

[1] 南京大学化学系有机化学教研室. 有机化学(下册)[M]. 北京:高等教育出版社,1988;329.

[2] 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):3638-3644.

[3] 王朝虹,果德安,胡春华. 反相高效液相色谱法测定全血中马钱子碱和土的宁的含量[J]. 色谱,2003,21(4):382-384.

[4] 赵丽沙,董宇,黄飞华,等. HPLC 法同时测定延胡索中 5 种生物碱含量的建立及应用[J]. 中国临床药理学杂志,2018,27(1):15-19.

[5] 粟贵,廖林川,颜有仪,等. HPLC 同时测定生物样品中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的含量[J]. 中国药理学杂志,2009,44(12):946-950.

[6] 吕辰,丁涛,马昕,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中的 5 种双稠吡咯啉类生物碱[J]. 色谱,2013,31(11):1046-1050.

[7] 麦沛明,余胜兵,吴西梅,等. 分散液-液微萃取-气相色谱-质谱法同时测定中毒样品中有毒生物碱和鼠药[J]. 分析化学,2015,43(2):282-287.

[8] 杨玉林,温忆敏,芮振荣,等. 气相色谱-质谱联用技术分析中毒样品中四种生物碱[J]. 中国卫生检验杂志,2004,14(3):272-273.

[9] 王朝虹,何毅,张继宗. 生物检材中乌头碱的 GC/MS 分析[J]. 中国法医学杂志,2003,18(3):145-146.

[10] 张春华,吴惠勤,黄晓兰,等. 液相色谱-电喷雾串联质谱同时检测尿液和胃液中 12 种有毒生物碱[J]. 分析化学,2012,40

(6):862-869.

[11] 熊小婷,吴惠勤,黄晓兰. 液相色谱-电喷雾串联质谱同时检测血液中 8 种有毒生物碱[J]. 分析化学,2009,37(10):1433-1438.

[12] 马晓斐,梁天佐,宋炜,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定中草药饮料中 11 种有毒生物碱[J]. 食品科学,2014,35(8):226-230.

[13] 刘伟,沈敏,沈保华,等. LC-MS/MS-MRM 筛选血液中 22 种有毒生物碱成分[J]. 法医学杂志,2007,23(5):349-352.

[14] 李晓雯,沈保华,卓先义. 液相色谱-高分辨质谱联用技术在毒物筛选分析中的应用[J]. 法医学杂志,2011,27(5):376-381.

[15] 刘佳铭,苗水,李雯婷,等. 高分辨质谱技术在农药残留检测中的应用[J]. 分析实验室,2020,39(1):116-124.

[16] 张婧,吴剑平,贡松松,等. 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱同时快速筛查与确证猪粪中 33 种磺胺类及四环素类药物[J]. 上海畜牧兽医通讯,2019(6):29-32.

[17] 李岳,李珉,纪宏,等. 利用高分辨四级杆静电场轨道阱质谱快速定性和定量筛查确证中药保健品中的 114 种非法添加药物[J]. 中国药理学杂志,2019,54(21):1804-1816.

[18] 胡巧茹,曹鹏,丛中笑,等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱对粮谷产品中 20 种真菌毒素的快速筛查和确证[J]. 色谱,2019,37(11):1241-1248.

[19] 贺巍巍,赵云峰,陈达炜,等. 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定尿液中的毒蕈碱[J]. 中国食品卫生杂志,2016,28(3):314-318.

[20] 周贤春,何春霞,苏力坦·阿巴白克力. 生物碱的研究进展[J]. 生物技术通讯,2006,17(3):476-479.

[21] European Union. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed;SANTE/11813/2017[S]. 2017.

· 公告 ·

关于瑞士乳杆菌 R0052 等 53 种“三新食品”的公告

2020 年第 4 号

根据《食品安全法》规定,审评机构组织专家对瑞士乳杆菌 R0052 等 4 种新食品原料、三赞胶等 21 种食品添加剂新品种、辛酸锌等 28 种食品相关产品新品种的安全性评估材料审查并通过。

特此公告。

国家卫生健康委
二〇二〇年五月二十日

(相关链接:<http://www.nhc.gov.cn/sps/s7890/202006/d8e8073a2f064faf8496fea654835784.shtml>)