

## 液相色谱-质谱法测定云南草乌中双酯型生物碱的含量

李继印<sup>1)</sup>, 张瑞林<sup>1)</sup>, 方平<sup>2)</sup>, 薛薇<sup>1)</sup>, 郑贵红<sup>3)</sup>, 李树华<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学法学院, 云南昆明 650500; 2) 云南省公安厅刑侦总队, 云南昆明 650228; 3) 禄劝县公安局, 云南禄劝 651500)

**[摘要]** 目的 采用液相色谱-串联质谱法测定云南4种不同产地草乌中双酯型生物碱(乌头碱、次乌头碱、新乌头碱)的含量。方法 草乌块根粉碎后经甲醇浸泡, 用液相色谱-串联质谱仪检测, 分别采用多个特征离子和外标标准曲线法对3种乌头碱进行定性、定量分析。结果 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱在1~100 ng/mL范围内线性关系良好( $r$ 分别为0.999 9, 1.000 0和0.999 9), 检出限分别为0.33 ng/mL、0.15 ng/mL和0.03 ng/mL; 回收率均高于98%, 日内及日间精密度均小于5%。测定结果表明, 4种草乌中均含有乌头碱、次乌头碱和新乌头碱, 但含量有差异。结论 液相色谱-串联质谱法简便快速, 可试用于生物样品中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的检验。

**[关键词]** LC-MS/MS; 云南草乌; 乌头碱; 次乌头碱; 新乌头碱

**[中图分类号]** G642.0 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2015)10-0005-04

## Determination of the Content of Diester Type Aconitum Alkaloids in Yunnan Kusnezoff Monkshood by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

LI Ji-yin<sup>1)</sup>, ZHANG Rui-lin<sup>1)</sup>, FANG Ping<sup>2)</sup>, BI wei<sup>1)</sup>, ZHENG Gui-hong<sup>3)</sup>, LI Shu-hua<sup>1)</sup>

(1) School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Criminal Investigation Corps, The Public Security Bureau of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650228; 3) Luquan County Public Security Bureau, Luquan Yunnan 651500, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the content of four different origin type double ester alkaloids of radix aconiti (aconitine, hypaconitine and new aconitine) in Yunnan Kusnezoff Monkshood by LC-MS/MS method. **Methods** The roots of radix aconiti kusnezoffii were soaked with methanol after crushed, which were analysed by LC-MS/MS, multiple characteristic ion pairs and the external standard method were adopted to aconitine, hypaconitine and mesaconine for qualitative and quantitative analysis respectively. **Results** The linear ranges were 1~100 ng/mL for three alkaloids (correlation coefficient are 0.9999, 1.000 0, 0.999 9 respectively). The detection limits were 0.33 ng/mL, 0.15 ng/mL and 0.03 ng/mL respectively. The recoveries were above 98%, intra- and inter-day precisions were all less than 5%. The determination results showed that there were aconitine, hypaconitine and mesaconine in 4 radix aconiti kusnezoffii, but the contents were different. **Conclusion** The method is accurate, sensitive, specific and simple, can be used to detect aconitine, hypaconitine and mesaconine in biological samples.

**[Key words]** LC-MS/MS; Yunnan kusnezoff monkshood; Aconitine; Hypaconitine; Mesaconine

草乌为毛茛科(Ranunculaceae)乌头属植物 以黄草乌或滇南草乌为基源植物<sup>[1]</sup>, 云南乌头属植物(Aconitum L) 与北草乌不同的是云南草乌主要 物资源有66种<sup>[2-3]</sup>, 分布广泛, 主要分布于滇西

**[基金项目]** 云南省应用基础研究基金资助项目(2013FB118); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2014Y161)

**[作者简介]** 李继印(1989~), 男, 河南商丘市人, 在读硕士研究生, 主要从事法医毒物分析工作。

**[通信作者]** 李树华. E-mail: 2530428326@qq.com

北。以北草乌为基源植物的草乌中主要成分为双酯型生物碱，即乌头碱、次乌头碱和新乌头碱等。而云南草乌中主要成分为滇乌碱、粗茎乌头碱甲、丽乌碱等<sup>[4]</sup>。研究表明，草乌具有镇痛、抗炎、抗癫痫、抗肿瘤、提高免疫力等多种药理作用<sup>[5-7]</sup>，常被历代医家所习用；但因毒性强，安全范围窄<sup>[8]</sup>，中毒案（事）件不断发生，尤其以草乌酒中毒案（事）件居多。双酯型生物碱即乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等，既是草乌中的主要毒性成分，同时也是药理活性成分。赵翡翠等<sup>[9]</sup>测定了新疆乌头属植物中双酯型生物碱的含量，目前未见云南草乌中双酯型生物碱的含量检测的报道。笔者因科研研究需要，检测了采自云南楚雄南华县和牟定县、红河州个旧市和开远市的 4 种草乌中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的含量。结果表明，不同产地以及不同采收季节采集的草乌中，乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的含量差别较大。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂** 乌头碱、次乌头碱和新乌头碱标准品均购自成都曼斯特生物科技有限公司；草乌块根分别采自云南楚雄州南华县（1 号）和牟定县（2 号），红河州个旧市（3 号）和开远市（4 号）。采集时间分别为 2013 年 10 月（楚雄州草乌）和 2013 年 7 月（红河州草乌）。4 种草乌均由云南中医学院杨耀文副教授鉴定证实。

**1.1.2 仪器** LC-MS/MS 三重四极杆串联质谱仪（Agilent1290 型高效液相色谱仪，Analyst<sup>®</sup> software 工作站和 AB SCIEX 4000Q TRAP 串联质谱仪，电喷雾离子源），赛多利斯 BT125D 电子天平。

### 1.2 方法

**1.2.1 分析条件** 液相条件：Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 色谱柱（2.1 mm × 50 mm，1.7 μm）；流动相：A 为乙腈，B 为 0.1% 氨水溶液。梯度洗脱：0 min ~ 2 min，流动相 A 为 10%；2 ~ 3 min，流动相 A 为由 10% 升到 50%；3 ~ 5 min，流动相 A 为由 50% 升到 90%；5 ~ 6 min，流动相 A 为由 90% 降到 10%；6 ~ 7 min，流动相 A 为 10%。流速：0.4 mL/min，柱温 25 °C，进样体积：2 μL。

质谱条件：电喷雾离子源，正离子模式，三重四极杆检测器，MRM 检测模式；乌头碱的定量离子对 646.5/586.4；次乌头碱的定量离子对 616.3/556.3；新乌头碱的定量离子对 632.4/572.4。

**1.2.2 样品处理** 分别将前述草乌块根粉碎后过 3

号筛，精确称取 1.00 g，经色谱级甲醇浸泡 17 d 后，滤出浸泡液，再以甲醇涮洗草乌块根粉 2 次，得到 7 mL 浸泡液。

各取 4 种浸泡液适量，分别用甲醇稀释 400 倍，经有机滤膜（13 mm × 0.22 μm）过滤后，得到 4 种待测液 1，用于检测次乌头碱和新乌头碱成分。依次再取 4 种待测液 1，甲醇稀释 10 倍后，得到 4 种待测液 2，用于检测乌头碱成分。

## 2 结果

### 2.1 系统适用性试验

在 1.2.1 节所描述的条件下，甲醇、混合对照品溶液、待测液 1 和 2 的 LC-MS/MS 谱图，见图 1。空白溶剂中不含待测物，检材中杂质不干扰样品检测，方法专属性好。

### 2.2 流动相的选择

分别考察了碱性流动相（流动相 B 为 0.1% 氨水）和酸性流动相（流动相 B 为 0.1% 和 0.3% 甲酸-水溶液）对待测物的灵敏度及峰形影响。结果表明，乌头碱、次乌头碱和新乌头碱在碱性流动相下分离效果好，最终选用流动相为乙腈-0.1% 氨水溶液。

### 2.3 线性和检出限及定量限

配制乌头碱、次乌头碱和新乌头碱质量浓度为 1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 的混合对照品溶液，按 1.2.1 节条件测定，以定量离子的峰面积（Y）对质量浓度（X，ng/mL）进行线性回归（表 1）。取线性最低点溶液逐级稀释后测定，得乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的最低检出限分别为 0.33 ng/mL、0.15 ng/mL、0.03 ng/mL（S/N > 3），最低定量限分别为 1.0 ng/mL、0.5 ng/mL、0.1 ng/mL（S/N > 10）。

### 2.4 准确度、精密度、回收率及稳定性

表 1 乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的线性关系

Tab. 1 Linearity relation of aconitine, hypaconitine and mesaconine

| 目标物  | 线性  | 线性范围        | 相关系数 (r) |
|------|---|-------------|----------|
| 乌头碱  | $y=1.51 \times 10^3 x + 3.36 \times 10^3$ | 1~100 ng/mL | 0.9999   |
| 次乌头碱 | $y=1.74 \times 10^4 x + 3.16 \times 10^3$ | 1~100 ng/mL | 1.0000   |
| 新乌头碱 | $y=262 \times x + 619$                    | 1~100 ng/mL | 1.0000   |

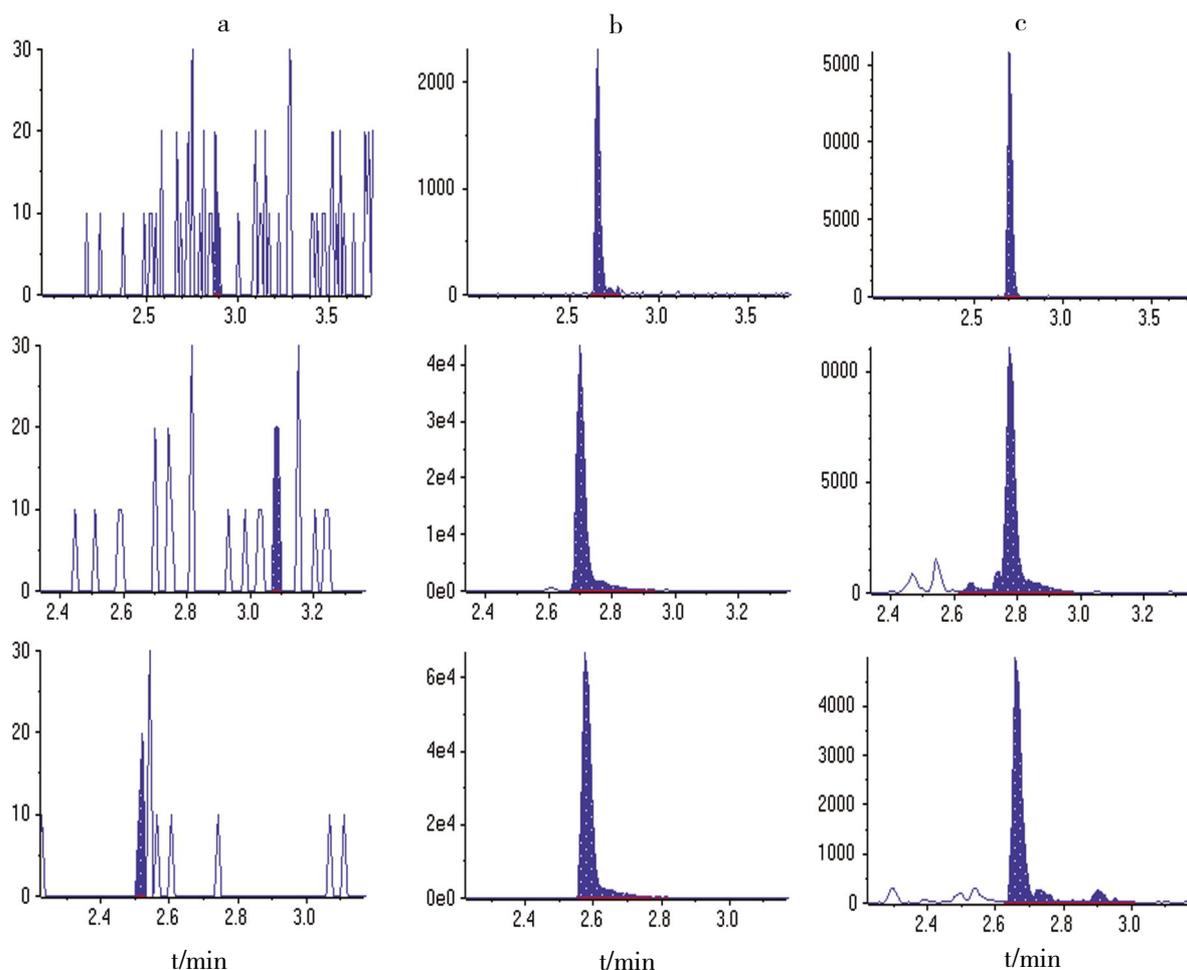


图 1 (a) 甲醇溶剂空白、(b) 乌头碱、次乌头碱和新乌头碱混合对照品溶液 (50ng/mL)、(c) 待测样的 LC-MS/MS 定性和定量离子流谱图

Fig. 1 LC-MS/MS qualitative and quantitative ion current chromatograms of (a) methanol, (b) mixed standard solution (20 ng/mL) and (c) samples

配制乌头碱、次乌头碱和新乌头碱低、中、高 (10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL) 3 个浓度混标溶液, 每个浓度 6 份, 按 1.2.1 节条件测定, 以所得峰面积计算日内精密度和准确度; 连续测定 3 d, 计算日间精密度. 将上述样品在室温放置 24 h 及 3 次冻融循环后, 按 1.2.1 节条件测定, 考察其短期稳定性和冻融稳定性.

取 1.2.2 节中的一种待测液 1 (个旧草乌: 次乌头碱和新乌头碱含量分别为 4.05 ng/mL 和 0.50 ng/mL) 0.5 mL, 添加 0.5 mL 次乌头碱和新乌头碱标准溶液 (100 ng/mL), 得到次乌头碱和新乌头碱含量分别为 52.03 ng/mL, 50.25 ng/mL 的基质加标溶液 1; 取 1.2.2 节中的一种待测液 2 (个旧草乌: 乌头碱含量为 35.10 ng/mL) 0.5 mL, 添加 0.5 mL 乌头碱标准溶液 (100 ng/mL), 得到浓度为 67.55 ng/mL 的基质加标溶液 2. 平行配制 6 份基质加标溶液 1 和 2, 按 1.2 节条件测定, 以计算回收率

(表 2).

## 2.5 样品测定

按 1.2.1 节条件测定 1.2.2 节中的 4 种待测液 1 和 2, 待测液 1 和 2 的含量经换算后, 得 4 种草乌中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的含量 (表 3).

## 3 讨论

目前, 多用 LC 或 LC-MS/MS 法检测复杂检材中的乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的含量<sup>[9-15]</sup>. 本文优化了文献报道的乌头类生物碱测定的色谱条件, 并经方法学可靠性验证后, 用以测定云南草乌中 3 种乌头类生物碱的含量, 结果表明: 不同产地的云南草乌中 3 种乌头类生物碱的含量有差异.

张聿梅等<sup>[16]</sup>研究发现: 草乌中新乌头碱的含量最高. 笔者检测的 4 种云南草乌中, 乌头碱的含量均高于次乌头碱和新乌头碱; 楚雄州的 2 种草乌

表 2 乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的精密度、准确度、回收率及稳定性 ( $\bar{x} \pm s$ )Tab. 2 Precisions, accuracies, recoveries and stabilities of aconitine, hyaconitine and mesaconine ( $\bar{x} \pm s$ )

| 目标物  | 浓度<br>(ng/mL) | 精密度 (%) $n=6$ |          | 准确度<br>(%)  | 回收率<br>(%)  | 稳定性 (ng/mL) |             |
|------|---------------|---------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|      |               | 日内 $n=3$      | 日间 $n=6$ |             |             | 短期          | 冻融          |
| 乌头碱  | 10            | 3.3           | 0.0      | 99.4 ± 6.6  | 101.0 ± 7.4 | 10.1 ± 0.7  | 13.0 ± 0.6  |
|      | 50            | 4.5           | 4.8      | 100.0 ± 1.8 | 101.4 ± 4.2 | 50.7 ± 1.1  | 52.7 ± 1.3  |
|      | 100           | 3.0           | 4.1      | 100.1 ± 2.2 | 98.7 ± 2.3  | 98.7 ± 2.3  | 104.0 ± 0.0 |
| 次乌头碱 | 10            | 0.2           | 1.5      | 101.5 ± 5.1 | 101.0 ± 2.0 | 10.1 ± 0.2  | 8.9 ± 0.4   |
|      | 50            | 1.1           | 0.6      | 100.0 ± 1.8 | 100.0 ± 1.8 | 50.0 ± 0.9  | 46.0 ± 0.8  |
|      | 100           | 0.3           | 0.4      | 100.1 ± 0.6 | 100.3 ± 0.7 | 100.3 ± 0.7 | 93.5 ± 0.7  |
| 新乌头碱 | 10            | 0.8           | 0.5      | 99.5 ± 3.4  | 99.0 ± 4.0  | 9.9 ± 0.3   | 9.3 ± 0.3   |
|      | 50            | 1.1           | 0.0      | 99.9 ± 0.5  | 100.8 ± 0.6 | 50.7 ± 0.6  | 50.7 ± 0.0  |
|      | 100           | 1.8           | 0.1      | 99.8 ± 1.3  | 98.9 ± 1.5  | 98.9 ± 1.1  | 92.4 ± 0.5  |

表 3 4 种草乌中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的含量

Tab. 3 Quantitative results of aconitine, hyaconitine and mesaconine in 4 radix aconiti kusnezoffii

| 样品批号      | 乌头碱       | 次乌头碱      | 新乌头碱      |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
|           | 含量 (mg/g) | 含量 (mg/g) | 含量 (mg/g) |
| 南华县 (1 号) | 3.16      | 0.04      | 0.01      |
| 牟定县 (2 号) | 3.01      | 0.04      | 0.05      |
| 个旧市 (3 号) | 1.23      | 0.01      | 0.01      |
| 开远市 (4 号) | 0.90      | 0.01      | 0.001     |

中乌头碱含量明显高于红河州草乌, 次乌头碱和新乌头碱含量差异不明显; 这可能与种属、地域、气候和采集时间不一致有关。因此, 本研究对云南草乌的开发、利用具有现实意义。

### [参考文献]

- [1] 云南省卫生厅主编. 云南生药品标准[M]. 昆明: 云南大学出版社, 1997: 76.
- [2] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志 (第 11 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 51, 108.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 220.
- [4] 袁梅, 马晓霞, 杨树德, 等. 滇西乌头化学成分研究[J]. 中药材, 2013, 36(6): 938 - 940.
- [5] 凌珊. 草乌的研究进展 [J]. 江西中医学院学报 2011, 23(3): 90 - 94.
- [6] 于占江, 赵国君, 贾鹏钰. 草乌的应用研究及前景展望[J]. 包头医学院学报, 2012, 28(3): 122 - 123.
- [7] 马天宇, 俞腾飞, 李树民, 等. 乌头类中药毒代动力学及代谢组学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 1972 - 1975.
- [8] 瞿建刚. 乌头类药物的毒性和用量探讨[J]. 北方药学, 2013, 10(11): 12.
- [9] 赵翡翠, 姜林, 刘淑敏, 等. 新疆乌头属植物中双酯型生物碱的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(20): 1603 - 1606.
- [10] 王朝虹, 文蛟, 何毅. 液相色谱 - 质谱联用测定乌头碱血药浓度及其药代动力学参数的方法学研究 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(12): 51 - 53.
- [11] 王海龙, 董雷, 许大方, 等. 中毒动物生物检材中乌头类生物碱的 LC/MS/MS 分析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 1(12): 191 - 193.
- [12] 武洁, 沈红, 朱玲英, 等. 液 - 质联用法同时测定大鼠血浆中的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱及其药代动力学[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(14): 1162 - 1166.
- [13] 马芳, 赵东, 吴晓霞, 等. 利用 LC/MS/MS 方法检测附子水提液中乌头碱的含量方法学研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(5): 564 - 565.
- [14] 任欣欣, 李兴华, 叶莎, 等. HPLC 测定复脉灵胶囊中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 19(18): 131 - 134.
- [15] WANG X, WANG H, ZHANG A, et al. Metabolomics study on the toxicity of aconite root and its processed products using ultraperformance liquid chromatography/electrospray - ionization synapt high-definition mass spectrometry coupled with pattern recognition approach and ingenuity pathways analysis [J]. J Proteome Res, 2012, 11(2): 1284.
- [16] 张聿梅, 谢黔锋, 鲁静, 等. 草乌药材标准修订研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5): 940 - 944.

(2015 - 04 - 10 收稿)