

## 实验技术与方法

## GC/MS 测定断肠草中钩吻碱方法研究

黄伟雄<sup>1,2</sup> 李汴生<sup>2</sup> 梁春穗<sup>1</sup> 范山湖<sup>1</sup> 戴光伟<sup>1</sup>

(1. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 510300;

2. 华南理工大学食品与轻工学院, 广东 广州 510641)

**摘要:**目的 建立气相色谱-质谱联用法检测断肠草中钩吻碱的方法。方法 试样经碱液振荡和超声提取后,用三氯甲烷萃取,用毛细管柱 HP-5MS 进行分离,采用电离方式(EI),气相色谱/质谱联用仪检测断肠草的钩吻碱含量。结果 方法检出限为 0.2 mg/kg;回收率 84.2%~92.6%,相对标准偏差小于 5%。结论 本方法简便、准确、灵敏度高,重现性好,适用于食物中毒样品的定性和定量分析。

**关键词:**钩吻;钩吻碱;碎片质谱法

### Determination of Gelsemine in Graceful Jessamine Herb by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

HUANG Wei-xiong, LI Bian-sheng, LIANG Chun-sui, FAN Shan-hu, DAI Guang-wei

(Guangdong Province Center for Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 510300, China)

**Abstract: Objective** To establish the method of gas chromatography with mass spectrometry for determination of gelsemine in graceful jessamine herb. **Methods** The samples were first extracted by alkali liquor with vibration and ultrasonic, then extracted with chloroform, separated on a HP-5MS column and detected by gas chromatography with mass spectrometry with electricity ionization (EI) mode. **Results** The limit of detection was 0.2 mg/kg. The recovery range was from 84.2% to 92.6%, and relative standard deviation was lower than 5%. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive, and suitable for qualitative and quantitative analysis for food poisoning samples.

**Key word:** GELSEMIUM ELEGANS; GELSEMINE; Mass Fragmentography

断肠草 (*Thevetia Peruviana*) 又名大茶药,这种植物全株都有毒,特别是嫩芽毒性最强。植株中分离出的毒素即钩吻毒素又叫钩吻碱 (Gelsemine),属于吲哚碱类。生长于中国的钩吻植株中含有毒素 17 种单体,不同地方生长所含的生物碱也不尽相同,钩吻碱的结构不同,其理化性质和毒性也不同,如钩吻碱真的毒性比钩吻素甲大得多。我国断肠草中所含生物碱以钩吻素甲含量最高,一般用其根 3 g 或嫩草 7 枚煎水服下即可致死,含毒成分为钩吻碱。钩吻碱 0.15~0.3 g 便可使人致死,钩吻碱是极强的神经毒,可直接抑制中枢神经系统,使呼吸中枢麻痹,导致呼吸衰竭而死亡<sup>[1,2]</sup>。

由于断肠草常常缠绕和混杂在其他植物中,且形状与一些常用煲汤药材如“金锁匙 (*Polygala japonica* Houtt.)”十分相似,容易混淆,群众难以鉴别并剔除。2003 年以来,广东省发生因误食断肠草中毒致死的事件呈逐年攀升趋势,清远、梅州、韶关、河

源等山区,中毒人数 38 人,死亡 16 人,给人民群众身体健康带来极大威胁。由此急需建立一种准确快速的定性、定量检验方法。目前,常用的钩吻碱检测方法仍以《中华人民共和国药典》<sup>[3]</sup> 的提取方法为主,或用酸碱回流多次提取<sup>[4]</sup>,有机溶剂抽提<sup>[5]</sup>,然后用薄层色谱<sup>[6]</sup>、液相色谱或气质联用法检测<sup>[7]</sup>。本文参照有关资料<sup>[8,9]</sup>,根据钩吻碱的理化性质,采用氢氧化钠溶液振荡,超声提取后再用三氯甲烷萃取,气质联用仪测定大茶药中钩吻碱的分析方法,为食物中毒或药物中毒诊断提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

气相色谱-质谱联用仪(岛津 GC2010)、色谱柱:毛细管柱 HP-5MS (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm)、超声波提取仪(HENGAO 公司 HS20500D 20L)、旋涡振荡器(IKA 公司 MS2 Minishaker)、水浴锅(上海一恒科技有限公司 HWS28 型电热恒温水浴箱)。

钩吻素甲 (gelsemine),纯度 99.0%,分子式 C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,分子量 322, SIGMA 公司。

基金项目:2005 年度广东省医学科研指令性课题(C2005007)

作者简介:黄伟雄 男 主任技师

**标准溶液配制** 准确称取钩吻素甲标准品,用三氯甲烷配制成 2.0 mg/L 的储备液。

**分析纯试剂** 三氯甲烷、氢氧化钠、无水硫酸钠 (450 °C 下烘烤 4 h)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 试样提取

**1.2.1.1 固体** 将试样剪碎并搅拌混匀后,称取 1~5 g 于 100 ml 比色管中,加入 5% 氢氧化钠溶液 50 ml (以浸过试样量为准),在振荡器上振荡 5 min,超声波提取 15 min,吸取提取液 35 ml 于分液漏斗中,分别用三氯甲烷 60 ml、40 ml 提取 2 次,合并提取液于水浴上浓缩至约 2 ml<sup>[10]</sup>,待净化。

**1.2.1.2 汤药等液体** 吸取 10~20 ml 试样于 100 ml 比色管中,加入 5% 的氢氧化钠溶液 50 ml,以下操作步骤同 1.2.1.1。

**1.2.2 净化** 将试样提取液置于装有 15 g 无水硫酸钠的漏斗中,用 30 ml 三氯甲烷缓慢淋洗,收集洗脱液,在 50 °C 水浴上浓缩后,用三氯甲烷定容至 2 ml,待测。

### 1.2.3 仪器条件

**色谱条件** 进样口温度 200 °C;柱温 230 °C,保持 5 min,15 °C/min,升至 250 °C,保持 30 min。

**质谱条件** 界面温度 200 °C,质谱温度 280 °C,电压 70 eV。

**选择离子方法 (SIM)** 钩吻素甲的主要特征峰设定为:  $m/z$  108 (基峰)、251、279 和  $m/z$  322 (分子离子峰)<sup>[11]</sup>。

### 1.2.4 定性和定量检测

选取钩吻素甲的特征碎片离子  $m/z$  108、251、279 和 322 为定性离子,各离子的丰度为  $m/z$  108

(100%)、251 (25%)、279 (50%) 和 322 (50%),并要求试样中各离子的丰度不得超过标准的  $\pm 20\%$ 。以钩吻素甲的基峰  $m/z$  108 作为定量离子,以标准系列浓度为横坐标,标准定量离子峰面积为纵坐标制作校正曲线,待测目标化合物定量离子峰面积与相应校正曲线比较定量。

## 2 结果

**2.1 钩吻素甲标准浓度为 110.4 mg/L,全扫描方式 TIC 图谱 (Scan) 见图 1,扫描质量范围:50~400;扫描时段:10~45 min,采用全扫描质谱库 NIST 检索,以特征离子定性,钩吻素甲标准的保留时间为 30.99 min。**

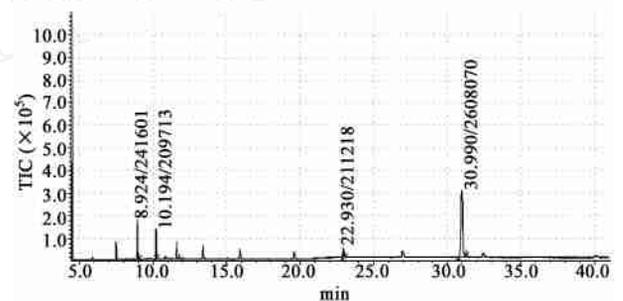


图 1 钩吻素甲标准品 TIC (Scan) 图谱

**2.2 根据欧盟物质残留分析要求,选择的特征离子至少有 3 个才能达标;而且,特征离子丰度的变化不能大于标准相同丰度的  $\pm 20\%$ 。以钩吻素甲的 4 个特征碎片离子  $m/z$  108、251、279 和 322,进行选择离子方式扫描,钩吻素甲标准浓度为 2.208 mg/L,选择离子 TIC 图谱 (SIM) 见图 3,方法定量检出下限为 ( $S/N = 5$ ) 0.2 mg/kg<sup>[12]</sup>。**

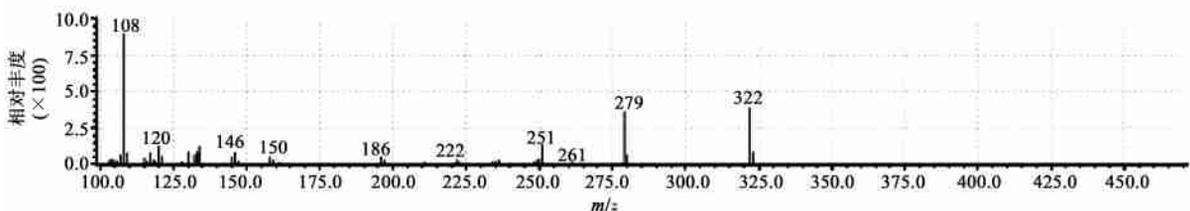


图 2 钩吻素甲标准品质谱结构图

**2.3 采用不含钩吻碱的植物“金锁匙”试样作为本底,分别添加钩吻素甲标准 1.0、2.0、5.0 mg/kg,各进行 5 次回收率试验,结果见表 1,回收率范围 84.2%~92.6%。**

**2.4 精密度试验** 称取 6 份研碎混匀的英德断肠草 (*Thevetia Peruviana*) 10.0 g 试样,测定平均值为 208.3 mg/kg,相对标准偏差 ( $RSD$ ) 为 0.39%,符合分析测定要求。

## 3 讨论

**3.1 提取方法的选择** 药典和其它参考方法对钩吻碱的提取都采用先把浸泡溶液调至酸性回流提取液,然后将酸性提取液再调至碱性回流提取液,最后用有机溶剂萃取,不但操作步骤多,而且实验时间长。为减少操作的步骤,缩短实验时间,本文根据钩吻碱具有碱性的特点,分别采用 1%、5%、10% 氢氧化钠溶液进行提取。实验结果表明,1% 的氢氧化钠

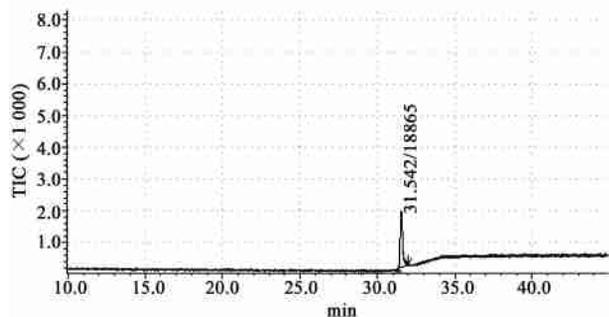


图3 钩吻素甲标准品 TIC(SIM) 图谱

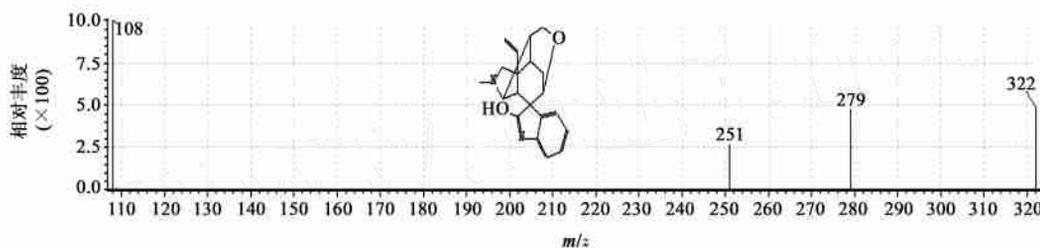


图4 钩吻素甲标准品质谱结构图谱

表1 以“金锁匙”样品为基体的钩吻素甲

回收率试验 (n=5)				
金锁匙样品 (mg/kg)	钩吻素甲标准品添加量 (mg/kg)	测定平均值 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
<0.2	1.0	0.926	92.6	5.8
<0.2	2.0	1.788	89.4	6.6
<0.2	5.0	4.210	84.2	6.1

表2 不同提取方式效果比较 (n=5)

金锁匙样品 (mg/kg)	钩吻素甲添加量 (mg/kg)	振荡测定平均值 (mg/kg)	回收率 (%)	振荡、超声测定平均值 (mg/kg)	回收率 (%)
<0.2	1.0	0.702	70.2	0.926	92.6
<0.2	2.0	1.432	71.6	1.788	89.4
<0.2	5.0	3.625	72.5	4.210	84.2

3.3 样品分析结果 将采自广东省韶关、英德、连州、梅州4个山区的断肠草各1.0g进行测定,均检出钩吻素甲,含量分别为韶关31.3mg/kg、英德25.8mg/kg、连州55.7mg/kg、梅州107.1mg/kg,由此可见,不同地区生长的断肠草,其钩吻碱含量有较大差异。

溶液由于碱的浓度不够,提取效率较低,回收率只有50%~60%,而用5%和10%的氢氧化钠溶液,回收率均可达到80%~95%,本方法采用5%的氢氧化钠溶液提取。

3.2 超声波提取 鉴于超声波萃取生物检材中的药物也能获得较好效果,本文在碱液提取时,先用振荡器将碱液与试样充分混匀,再用超声波萃取法提取植物中的钩吻碱,提取效率得到进一步提高,实验结果见表2。

### 参考文献

- [1] 易金娥,袁慧. 钩吻碱毒性作用机理的研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2003(3): 231-233.
- [2] 周跃平,徐纬. 胡蔓藤碱甲的毒性及呼吸抑制作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1995(9): 69-72.
- [3] 中华人民共和国药典(一部)2005年版[M]. 北京:化学工业出版社.
- [4] 梁勇,温碧珍. 钩藤中总生物碱的提取分离研究[J]. 中国热带医学, 2006(1): 72-73.
- [5] 徐坚,梁崇真. 钩吻总生物碱提取方法的比较[J]. 药学通报, 1988,23(6):3411.
- [6] 陆冰真,翟永信,主编. 薄层层析法在食品分析中的应用[M]. 北京:北京大学出版社,1991:176-182.
- [7] 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): 272-273.
- [8] 桑向玲,赵楚云,施文兵,等. 超声波萃取气相色谱-质谱法测定胃内容物中的钩吻碱[J]. 广东公安科技, 2006(3): 26-28.
- [9] 张兰兰,黄昌全,张忠义,等. GC-MS对钩吻提取物成分的分析研究[J]. 中药材, 2005(09): 779-781.
- [10] 张兰兰,王志睿. 钩吻总生物碱中钩吻素子的提取与分离[J]. 第一军医大学学报, 2004(9): 815-816.
- [11] 邵昌松,肖惠贞. 用气相色谱-质谱联用技术分析钩吻碱中毒[J]. 中国卫生检验杂志, 1999(9): 40-41.
- [12] 张春水,郝瑛. 钩吻素甲的气相色谱-质谱分析[J]. 质谱学报, 2004(3): 256-258.

[收稿日期:2007-10-12]