

马鞭草中6个肝毒性吡咯里西啶生物碱的含量测定及风险评估

咎珂¹, 陈翠玲², 周颖³, 左甜甜¹, 金红宇¹, 王莹^{1*}, 马双成^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 梧州市食品药品检验所, 广西梧州 543000;
3. 浙江省食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 杭州 310052)

[摘要] 目的:建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)对马鞭草中6个肝毒性吡咯里西啶生物碱的含量进行测定,并根据测定结果进行初步的风险评估。方法:选择 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),以含 0.05% 甲酸和 2.5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵的水溶液(A)及含 0.05% 甲酸和 2.5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵的乙腈溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~12 min, 3%~8%B; 12~25 min, 8%~15%B; 25~26 min, 15%~3%B; 26~30 min, 3%B),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,进样量 1 μL;电喷雾离子源(ESI),正离子模式下多反应监测模式,通过优化三重四极杆的 MS 参数及 6 个分析物的 MS 参数进行定性、定量分析。根据含量测定结果,采用暴露限值(MOE)结合热水提取转移率进行风险评估。结果:通过仪器精密度、线性范围、重复性、稳定性和加样回收试验等方法学验证,其结果均符合定量分析的要求。印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝萆定氮氧化物和蓝萆定的线性范围分别为 0.984~49.20, 0.994~49.70, 1.012~50.60, 1.032~51.60, 1.004~50.20, 1.016~50.80 μg·L⁻¹,这 6 个成分在线性范围内峰面积与质量浓度均具有良好线性关系($r \geq 0.999$);平均加样回收率在 87.2%~94.2%,RSD 均 < 4.0%;MOE 均 > 1 万。结论:建立的 UPLC-MS/MS 稳定可行,可为马鞭草中肝毒性吡咯里西啶生物碱的质量控制和安全性评价提供科学依据。

[关键词] 马鞭草; 肝毒性成分; 吡咯里西啶生物碱(PAs); 超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS); 含量测定; 风险评估; 暴露限值(MOE)

[中图分类号] R22;R28;R931;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)24-0157-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211953

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20211009.1949.005.html>

[网络出版日期] 2021-10-11 8:48

Determination and Risk Assessment of Six Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids in Verbenae Herba

ZAN Ke¹, CHEN Cui-ling², ZHOU Ying³, ZUO Tian-tian¹, JIN Hong-yu¹,
WANG Ying^{1*}, MA Shuang-cheng^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China;
2. Wuzhou Institute for Food and Drug Control, Wuzhou 543000, China; 3. National Medical Products Administration Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Patent Medicine, Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

[Abstract] **Objective:** To establish ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for simultaneous determination of six hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in Verbenae Herba, and to carry out preliminary risk assessment according to the research results. **Method:** An ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used for analysis with 0.05% formic acid

[收稿日期] 20210714(018)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09735-006)

[第一作者] 咎珂, 博士, 副研究员, 从事中药检验与质量控制研究, Tel: 010-53852092, E-mail: 6206310@qq.com

[通信作者] * 马双成, 博士, 研究员, 从事中药民族药质量控制与评价研究, Tel: 010-53852076, E-mail: masc@nifdc.org.cn;

* 王莹, 博士, 副研究员, 从事中药天然药物质量评价与风险评估研究, Tel: 010-53852474, E-mail: wayi_1986@163.com

and 2.5 mmol·L⁻¹ ammonium formate in water (A)-0.05% formic acid and 2.5 mmol·L⁻¹ ammonium formate in acetonitrile (B) as mobile phase for gradient elution (0-12 min, 3%-8%B; 12-25 min, 8%-15%B; 25-26 min, 15%-3%B; 26-30 min, 3%B), the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 1 μL. MS system was operated by electrospray ionization (ESI) in the positive ion mode with multiple reaction monitoring mode. MS parameters of triple quadrupole and six analytes were optimized for qualitative and quantitative analysis. According to the determination results, the risk assessment was carried out by using margin of exposure (MOE) combined with transfer rate of hot water extraction. **Result:** Based on the instrument precision, linear range, repeatability, stability, recovery and other methodological validations, the results were in conformity with relevant standards of quantitative analysis. The linear ranges of intermedine, lycopsamine, intermedine *N*-oxide, lycopsamine *N*-oxide, echimidine *N*-oxide and echimidine were good ($r \geq 0.999$) between peak area and mass concentration in the ranges of 0.984-49.20, 0.994-49.70, 1.012-50.60, 1.032-51.60, 1.004-50.20, 1.016-50.80 μg·L⁻¹, respectively. The average recoveries of these six analytes were 87.2%-94.2% with relative standard deviation (RSD) <4.0%. Their MOE values were >10 000. **Conclusion:** The UPLC-MS/MS established in this study is stable and feasible, which can provide scientific basis for the quality control and safety evaluation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in *Verbenae Herba*.

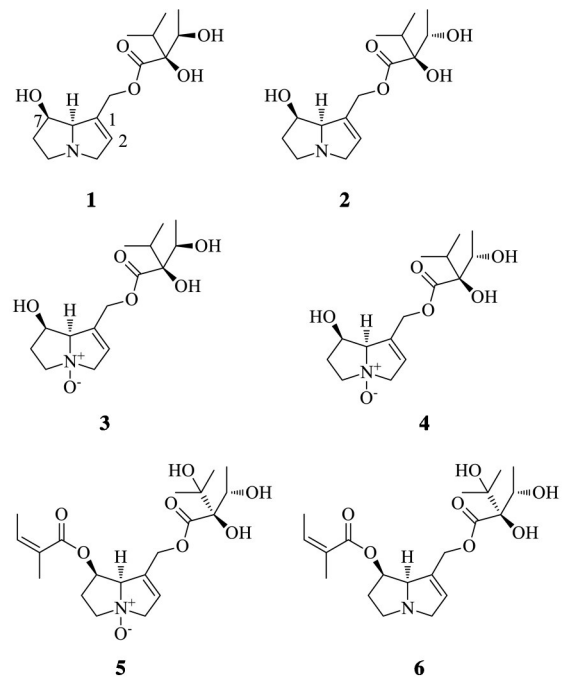
[Keywords] *Verbenae Herba*; hepatotoxic components; pyrrolizidine alkaloids (PAs); ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); determination; risk assessment; margin of exposure (MOE)

马鞭草在我国大部分省区有分布,其干燥地上部分作为中药材马鞭草使用,具有活血散瘀、解毒、利尿、退黄、截疟的功效,临床用于治疗癥瘕积聚、痛经经闭、喉痹、痈肿、水肿、黄疸、疟疾,是疏风解毒胶囊、丹益片等中成药的原料药之一^[1-2]。其主要含有环烯醚萜苷、苯丙素苷、三萜、黄酮等成分^[3-5]。

据报道,吡咯里西啶生物碱(PAs)广泛存在于有花高等植物中,目前有超过6 000种植物中已被检出PAs成分。吡咯啉环的1,2位为双键的PAs成分具有较强肝毒性,过量或长期摄入可引起不可逆的肝损伤,严重的可造成肝硬化和肝纤维化等问题^[6-8]。印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝萵定氮氧化物和蓝萵定均为1,2位不饱和的PAs,此类生物碱具有较强的肝毒性,是马鞭草中6个主要的PAs,其结构式见图1^[9-11]。PAs在药材中一般为微量或痕量成分,紫外吸收不强,常规的液相色谱法往往难以检测,液质联用技术是PAs检测的首选^[12-14]。基于此,本实验拟建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定马鞭草中印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝萵定氮氧化物和蓝萵定6个PAs的含量,并根据测定结果进行初步风险评估,以期为该药材的质量控制和安全性评价提供科学依据。

1 材料

ACQUITY™型超高效液相色谱仪和Xevo TQ-S



1. 印美定;2. 石松胺;3. 印美定氮氧化物;4. 石松胺氮氧化物;5. 蓝萵定氮氧化物;6. 蓝萵定

图1 马鞭草中6个主要PAs成分的结构式

Fig. 1 Chemical structures of PAs 1-6 in *Verbenae Herba*

型三重四极杆串联质谱检测器(美国沃特世公司), XS105DU型1/10万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), Milli-Q型超纯水系统(美国密理博公司)。印美定(批号82424,纯度99.07%),石松胺(批号89726,纯度99.11%),印美定氮氧化物(批号

13418, 纯度 100.00%), 石松胺氮氧化物(批号 83447, 纯度 96.75%) 和 蓝萘定氮氧化物(批号 12431, 纯度 99.87%) 均购自 PhytoLab GmbH 公司。蓝萘定(上海甄准生物科技有限公司, 批号 21J080-P1, 纯度 93.13%), 水为超纯水, 乙腈、甲醇、甲酸和甲酸铵均为质谱级, 其他试剂均为分析纯。阳离子交换固相萃取柱(500 mg/6 mL) 购自天津博纳艾杰尔科技有限公司。马鞭草样品共 8 批, 编号 S1~S8, 于 2020 年 6~7 月分别采自山东、江苏等地, 经中国食品药品检定研究院管珂副研究员鉴定为马鞭草科植物马鞭草 *Verbena officinalis* 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 精密称取印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝萘定氮氧化物和蓝萘定对照品适量, 分别加 10% 乙腈配成质量浓度分别为 492, 497, 506, 516, 502, 508 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的单一对照品储备液。精密称取各单一对照品储备液适量, 用 10% 乙腈配成质量浓度分别为 9.84, 9.94, 10.12, 10.32, 10.04, 10.16 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液 取马鞭草粉末(过四号筛, 下同) 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸水溶液 20 mL, 密塞, 称定质量, 超声 30 min(频率 40 kHz, 功率 300 W), 放冷, 再称定质量, 用 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸水溶液补足减失的质量, 摇匀, 经定量滤纸过滤, 取续滤液进行固相萃取柱(SPE 柱) 萃取。SPE 柱先用甲醇 5 mL 活化, 再用 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸水溶液 5 mL 平衡, 然后将上述续滤液 10 mL 上样。待吸附后加甲醇 10 mL 洗脱除去杂质, 加 8% 氨水甲醇溶液 10 mL 洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩至约 1 mL, 加 10% 乙腈稀释至 5 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

表 2 马鞭草中 6 个 PAs 含量测定的线性关系考察

Table 2 Linear relationship investigation of determination of 6 PAs in *Verbenae Herba*

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LLOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LLOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
印美定	$Y=9\ 125X-458$	0.999 1	0.984~49.20	0.20	0.49
石松胺	$Y=9\ 012X-852$	0.999 3	0.994~49.70	0.20	0.50
印美定氮氧化物	$Y=6\ 127X-745$	0.999 0	1.012~50.60	0.20	0.51
石松胺氮氧化物	$Y=5\ 692X-586$	0.999 1	1.032~51.60	0.21	0.52
蓝萘定氮氧化物	$Y=7\ 593X-425$	0.999 2	1.004~50.20	0.20	0.50
蓝萘定	$Y=8\ 576X-614$	0.999 1	1.016~50.80	0.20	0.51

2.2 检测条件 色谱条件为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm), 柱温设定 40 $^{\circ}\text{C}$, 流动相 0.05% 甲酸水溶液(A, 含 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵) 和 0.05% 甲酸乙腈溶液(B, 含 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵) 梯度洗脱(0~12 min, 3%~8%B; 12~25 min, 8%~15%B; 25~26 min, 15%~3%B; 26~30 min, 3%B), 流速 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 1 μL 。质谱条件为电喷雾离子源(ESI), 正离子模式下多反应监测(MRM)扫描, 毛细管电压 3.0 kV, 离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$, 去溶剂气温度 500 $^{\circ}\text{C}$; 6 个 PAs 的其他质谱条件见表 1。

表 1 马鞭草中 6 个 PAs 的 MS 参数

Table 1 MS parameters of 6 PAs in *Verbenae Herba*

成分	t_{R}/min	母离子 m/z	子离子 m/z		锥孔 电压/V	碰撞 能量/eV
			定量	定性		
印美定	7.29	300.2	94.1	138.1	26	30
石松胺	7.71	300.3	94.1	138.1	26	30
印美定氮氧化物	9.55	316.2	94.1	172.1	20	24
石松胺氮氧化物	10.12	316.3	94.1	172.1	20	24
蓝萘定氮氧化物	16.91	414.3	120.1	220.2	28	26
蓝萘定	17.22	398.3	254.2	396.3	36	32

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系、检测下限、定量下限考察 精密吸取 2.1.1 项下各单一对照品储备液 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mL, 分别置于不同的 10 mL 量瓶中, 即每个量瓶中加入同一体积的各单一对照品储备液, 加 10% 乙腈定容至刻度, 摇匀, 即得系列质量浓度的混合对照品溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 按 2.2 项下条件测定。以对照品的峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 进行线性回归。以定量离子的色谱峰信噪比(S/N) \geq 3 对应的最低质量浓度为检测下限(LLOD), 以定量离子色谱峰 S/N \geq 10 对应的最低质量浓度为定量下限(LLOQ), 见表 2。

2.3.2 精密度试验 精密吸取 2.1.1 项下混合对照品溶液 1 μL , 按 2.2 项下条件连续进样 6 次, 记录峰面积。结果印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝萘定氮氧化物和蓝萘定峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 2.1%, 2.3%, 2.8%, 2.4%, 2.5% 和 2.6%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一样品 S1 的供试品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.2 项下条件测定, 计算印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝萘定氮氧化物和蓝萘定峰面积的 RSD 分别为 2.0%, 2.2%, 2.4%, 2.7%, 2.3% 和 2.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 按照 2.1.2 项下方法制备样品 S1 的供试品溶液 6 份, 按 2.2 项下条件测定, 计算印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝萘定氮氧化物和蓝萘定的平均质量分数分别为 19.14, 21.41, 52.36, 46.83, 10.36, 40.14 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, RSD 分别为 3.1%, 3.5%, 2.8%, 2.5%, 3.3% 和 3.2%, 表明该方法的重复性良好。

表 3 马鞭草样品中 6 个 PAs 的含量测定 ($\bar{x}\pm s, n=2$)

Table 3 Contents of 6 PAs in Verbenae Herba ($\bar{x}\pm s, n=2$)

样品	产地	印美定	石松胺	印美定氮氧化物	石松胺氮氧化物	蓝萘定氮氧化物	蓝萘定	总量
S1	山东泰安	19.32±0.23	21.53±0.15	52.14±0.25	46.52±0.22	10.25±0.07	39.86±0.25	189.62±1.32
S2	山东临沂	18.57±0.15	15.42±0.08	42.25±0.32	39.82±0.37	13.52±0.11	17.95±0.12	147.53±1.58
S3	江苏南京	22.96±0.32	17.63±0.11	95.63±0.41	85.48±0.52	8.25±0.09	18.25±0.08	248.20±2.01
S4	江苏扬州	19.28±0.18	21.04±0.19	31.61±0.27	52.17±0.24	6.69±0.10	26.32±0.17	157.11±0.95
S5	湖南长沙	9.69±0.11	11.22±0.07	28.69±0.16	46.22±0.36	11.58±0.14	35.84±0.12	143.24±1.03
S6	湖南常德	12.74±0.08	18.74±0.12	48.85±0.31	37.21±0.19	9.63±0.11	26.38±0.16	153.55±1.28
S7	广西玉林	15.83±0.10	8.58±0.06	62.74±0.29	32.14±0.15	22.82±0.19	64.29±0.36	206.40±1.85
S8	广西桂林	20.69±0.12	16.75±0.15	49.41±0.34	96.84±0.56	16.64±0.13	42.85±0.29	243.18±2.14

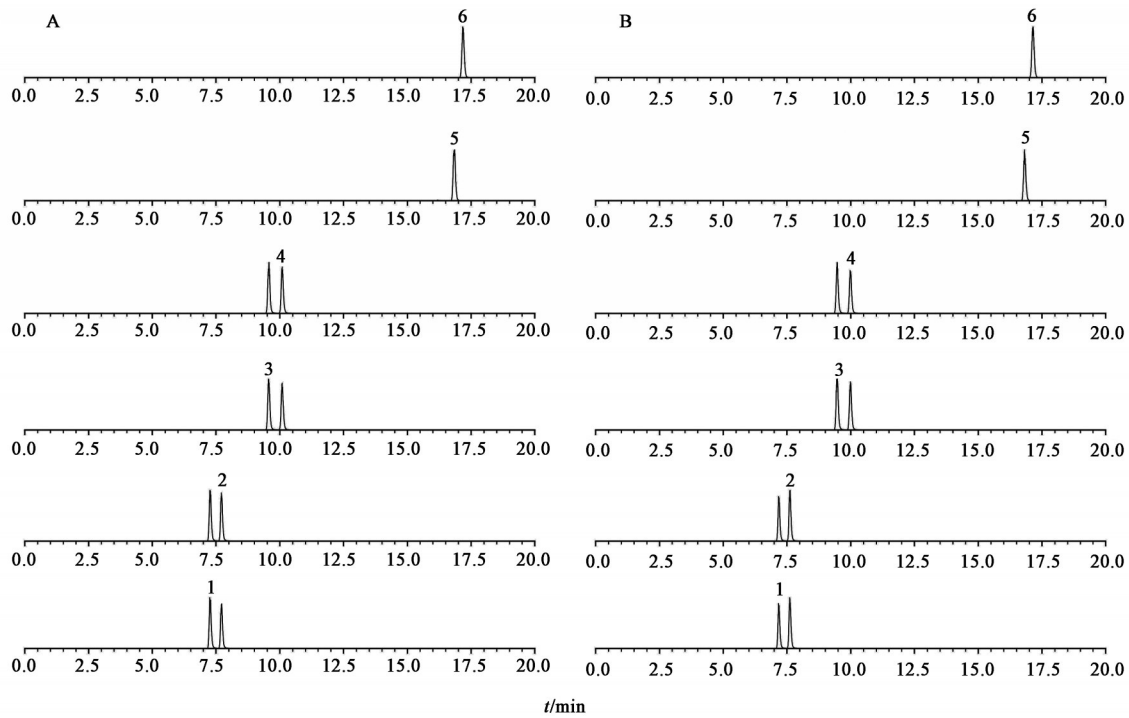
2.5 风险评估 目前, 世界各国权威机构对肝毒性 PAs 的风险评估均采用暴露限值(MOE)。MOE 是对动物或者人导致很小但可衡量作用的剂量与人或者动物的暴露量的比值。若物质导致不良作用的剂量与人群的摄入量越接近, 即 MOE 越低, 表明其对人群健康的危害越大。若 MOE>1 万, 健康风险较低; 反之, 风险应予以关注。根据文献[15]报道的方法计算 PAs 的 MOE。根据公式 $EDI=C\times M/(m\times 1000)$ 计算估计每日摄入量 (EDI, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 以体质量计算, 下同), 再根据公式 $MOE=BMDL_{10}/EDI$ 计算 MOE。式中 C 为药材中含有的 PAs 总量, 单位为 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; M 为 2020 年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)中规定的药材最大使用

2.3.5 加样回收试验 精密量取 2.1.1 项下印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝萘定氮氧化物和蓝萘定单一对照品储备液适量, 加 10% 乙腈配成上述 6 个成分质量浓度分别 19.68, 19.88, 50.60, 51.60, 10.04, 40.64 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。取已知各成分含量的样品 S1 粉末 6 份, 每份质量约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入上述混合对照品溶液各 1.0 mL, 加入 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸水溶液 19 mL, 密塞, 按 2.1.2 项下方法平行制备供试品溶液, 按 2.2 项下条件测定, 计算回收率, 印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝萘定氮氧化物和蓝萘定平均加样回收率分别为 92.3%, 94.2%, 88.9%, 92.8%, 87.2% 和 91.7%, RSD 分别为 3.8%, 3.5%, 3.6%, 3.4%, 3.0% 和 3.4%。

2.4 样品测定 准确称取不同产地的马鞭草药材 2.0 g, 分别按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2 项下条件测定, 依据外标法计算各成分含量, 见表 3。混合对照品溶液及马鞭草样品 S1 的 MRM 图谱见图 2。

剂量, 马鞭草为 10 g; m 为人体体质量, 按 70 kg 计算; 1 000 为换算因子, 由 g 换算为 kg。BMDL₁₀ 为 PAs 的健康指导值 237 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。以表 3 中马鞭草的 PAs 总量来计算, 8 批马鞭草样品的 MOE 分别为 8 749, 11 245, 6 684, 10 559, 11 582, 10 804, 8 038 和 6 822。但比利时学者研究 PAs 在热水中的提取率时发现, 本文所测的 6 个 PAs 在热水中的提取率处于 18%~27%, 最大提取率不到总量的 1/3^[16]。因此, 如考虑到热水中的转移率, 推测马鞭草的 MOE 将均>1 万, 故认为该药材风险较低。

丹益片和疏风解毒胶囊的处方中均含有马鞭草, 制备工艺均为水煎煮法提取, 根据 2020 年版《中国药典》中的处方和用量, 每片丹益片使用马鞭草



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 印美定; 2. 石松胺; 3. 印美定氮氧化物; 4. 石松胺氮氧化物; 5. 蓝薊定氮氧化物; 6. 蓝薊定

图2 马鞭草样品S1的MRM色谱

Fig. 2 MRM chromatograms of Verbenae Herba sample S1

药材 0.5 g, 每日服用 3 次, 每次 4 片, 相当于每日服用马鞭草药材 6 g; 每粒疏风解毒胶囊使用马鞭草药材 0.36 g, 每日服用 12 粒, 相当于每日服用马鞭草药材 4.32 g。根据药材中 MOE 计算结果, 结合热水中 PAs 转移率, 按规定服用这 2 种中成药, 马鞭草中 PAs 所产生的风险较低。

3 讨论与总结

3.1 检测方法的选择 本研究利用 UPLC-MS/MS 测定马鞭草中印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝薊定氮氧化物和蓝薊定的含量, 操作简单快速、准确。与传统 HPLC 相比, UPLC 具有更高的灵敏度和更好的分离度, 并且能缩短分析时间, 减少溶剂用量。三重四极杆质谱仪具有离子过滤的功能, 尤其适合复杂样品中化合物的定量分析。因此, 选择 UPLC-MS/MS 测定马鞭草中 PAs 成分的含量。

3.2 检测条件的确定

3.2.1 色谱条件 印美定和石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物为 2 对同分异构体, 结构上仅有 1 个碳原子的手性有区别, 需要通过色谱法将其分离, 通过调节流动相的比例, 适当延长保留时间, 实现色谱分离。预试验考察了多种色谱柱型号, 最终选用的 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱

(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 能够兼容 100% 水相, 适合极性较大化合物的分离。流动相中添加 0.05% 甲酸和 2.5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵可增强化合物的离子化, 提高检测灵敏度, 并且能够改善峰形。与甲醇-水系统相比, 乙腈-水系统能够将石松胺和印美定基线分离。因此, 本研究从 3% 的有机相作为起始溶剂, 缓慢提高有机相比比例, 最终 20 min 内实现 6 个 PAs 的色谱分离。

3.2.2 质谱条件 PAs 生物碱在溶液中常以正离子形式存在, 因此, 选择电喷雾离子源、正离子检测模式。通过扫描一级和二级质谱, 选择 [M+H]⁺ 峰作为母离子, 选择二级质谱中丰度最强的特征碎片作为定量离子, 丰度次强的特征碎片作为定性离子。定量方式选择 MRM 模式, 通过仪器自带的 IntelliStart 功能, 自动优化质谱参数, 选择最优的锥孔电压和碰撞能量进行实验, 以获得最高的灵敏度。同时, 优化毛细管电压、离子源温度和去溶剂气温度, 最终实现 6 个 PAs 的灵敏检测。

3.3 提取方法及样品前处理方法的选择 PAs 成分具有较大的极性和一定的碱性, 能溶于甲醇、酸水等溶剂。由于马鞭草中含有较高含量的黄酮等成分, 且 PAs 在马鞭草中含量较低, 选择阳离子交换树脂 SPE 柱进行富集净化是测定中药中 PAs 的常见

方法。为了方便后续的SPE,选择 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸水溶液作为溶剂提取样品。因为流动相以3%乙腈作为起始洗脱溶剂,为了与流动相比比例较为接近,SPE后,选择10%乙腈作为溶剂制备供试品溶液。

3.4 含量测定结果分析 8批马鞭草中PAs的含量测定结果显示,印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝萘定氮氧化物和蓝萘定的质量分数分别为9.69~22.96, 8.58~21.53, 28.69~95.63, 32.14~96.84, 6.69~22.82, 17.95~64.29 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。马鞭草中6个PAs成分均有检出,其中印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物是含量最高的2个成分。从产地分析,江苏南京、广西桂林和广西玉林产的马鞭草中PAs含量较高,总量均 $>200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$;但由于样品批次较少,产地和PAs含量之间的规律尚需每个产地采集多批药材进行对比分析后再得出。

3.5 总结 本实验建立的UPLC-MS/MS专属性强,可在20 min内快速分析马鞭草中印美定、石松胺、印美定氮氧化物、石松胺氮氧化物、蓝萘定氮氧化物和蓝萘定6个PAs的含量。经方法学验证,该方法灵敏度高、准确可靠,可为马鞭草及其复方制剂的质量控制提供参考依据。同时,本研究对马鞭草及其2020年版《中国药典》收录的2种含该药材的成方制剂进行了风险评估,采用文献提供的方法结合PAs的提取率计算,提示三者用药风险较低。另外,由于本研究所测药材批次较少,并且提取率采用的是文献数据,马鞭草中存在的PAs成分仍需进一步关注。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:53-54.
[2] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志:第65卷[M]. 北京:科学出版社,1982:15-16.
[3] 刘雅琳,苗晋鑫,田硕,等. 马鞭草化学成分及其药理作用研究进展[J]. 河南中医,2021,41(2):294-299.
[4] 何俊,樊瑜琪,杨丰文,等. 马鞭草化学成分及药理活性研究进展[J]. 天津中医药,2020,37(11):1205-1212.
[5] 马金华,杨勇勋. 马鞭草的化学成分研究[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2019,45(6):579-582.
[6] 高江国,王长虹,李岩,等. 吡咯里西啶生物碱的药理

作用、毒性及药(毒)物代谢动力学研究进展[J]. 中国中药杂志,2009,34(5):506-511.
[7] 郭严,张世荣,文良志,等. 我国吡咯烷生物碱致肝窦阻塞综合征的临床特征分析[J]. 临床肝胆病杂志,2018,34(6):1277-1281.
[8] 孙潇翔,向娥,邱帅凯,等. 吡咯里西啶生物碱毒性作用研究进展[J]. 中国药物警戒,2019,16(2):76-80.
[9] LETSYO E, JERZ G, WINTERHALTER P, et al. Incidence of pyrrolizidine alkaloids in herbal medicines from German retail markets risk assessment [J]. Phytother Res, 2017, 31(12): 1903-1909.
[10] WANG J C, ZHANG M, CHEN L H, et al. Determination of toxic pyrrolizidine alkaloids in traditional Chinese herbal medicines by UPLC-MS/MS and accompanying risk assessment for human health [J]. Molecules, 2021, 26(6): 1648.
[11] 王涛,宋海波. 吡咯里西啶类生物碱肝毒性研究进展及风险分析[J]. 医药导报,2018,37(9):1033-1037.
[12] BOLECHOVÁ M, CÁSLAVSKÝ J, POSPICHALOVÁ M, et al. UPLC-MS/MS method for determination of selected pyrrolizidine alkaloids in feed [J]. Food Chem, 2015, 170: 265-270.
[13] DZUMAN Z, ZACHARIASOVA M, VEPRIKOVA Z, et al. Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids [J]. Anal Chim Acta, 2015, 863: 29-40.
[14] MARTINELLO M, BORIN A, STELLA R, et al. Development and validation of a QuEChERS method coupled to liquid chromatography and high resolution mass spectrometry to determine pyrrolizidine and tropane alkaloids in honey [J]. Food Chem, 2017, 234: 295-302.
[15] CHEN L, MULDER P P J, PEIJNENBURG A, et al. Risk assessment of intake of pyrrolizidine alkaloids from herbal teas and medicines following realistic exposure scenarios [J]. Food Chem Toxicol, 2019, 136: 142-153.
[16] PICRON J F, HERMAN M, HOECK E V, et al. Analytical strategies for the determination of pyrrolizidine alkaloids in plant based food and examination of the transfer rate during the infusion process [J]. Food Chem, 2018, 266: 514-523.

[责任编辑 刘德文]