

基于 UPLC-MS/MS 同时测定款冬花中吡咯里西啶生物碱及其氮氧化物的含量

乔月, 陈丽华, 胡宏秀, 高冉冉, 邵昭慧, 斯建勇, 廖永红, 孙迪安*

(中国医学科学院 & 北京协和医学院药用植物研究所, 天然药物化学研究中心, 北京 100193)

[摘要] **目的:** 建立一种同时测定 15 个吡咯里西啶生物碱 (pyrrolidine alkaloids, PAs) 及其氮氧化物的超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC/MS/MS), 完成 15 批不同来源的款冬花样品的含量测定。从而初步了解不同来源款冬花中 PAs 的分布现状, 为药材的安全合理使用提供相关参考。**方法:** 采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (3.0 mm × 150 mm, 1.8 μm), 流动相为含 0.05% 甲酸和 2.5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵的水溶液 (A) 以及含 0.05% 甲酸和 2.5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵的甲醇 (B), 梯度洗脱, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 2 μL, 柱温 40 °C。采用 Agilent 1290-6470 QQQ 型超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪, 离子化模式为 ESI⁺, 多反应监测模式 (MRM)。利用外标法计算药材样品中所测成分的含量, 通过计算不同成分的相对标准偏差 (RSD) 对样品间的差异进行分析。**结果:** 建立的测定方法灵敏度高, 分离度良好, 方法学考察结果良好。样品测定结果表明, 15 批药材均含有 PAs 及其氮氧化物, 且所含 PAs 种类基本相同。克氏千里光碱 (senkirkine) 是款冬花中最主要的 PAs 类成分。药材款冬花中不同 PAs 的含量与分布有较大差异。**结论:** 款冬花中普遍含有吡咯里西啶生物碱及其氮氧化物, 且以具有显著肝毒性的克氏千里光碱为其中最主要种类。针对 PAs 的含量测定为确保款冬药材的用药安全提供了有效的保证。

[关键词] 款冬花; 吡咯里西啶生物碱; 氮氧化物; 克氏千里光碱

[中图分类号] R289; R284.1; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0155-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192013

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190708.1450.001.html>

[网络出版时间] 2019-07-10 08:35

Simultaneous Determination of Pyrrolidine Alkaloids and Their Nitrogen Oxides in Farfarae Flos by UPLC-MS/MS

QIAO Yue, CHEN Li-hua, HU Hong-xiu, GAO Ran-ran, GAO Zhao-hui, SI Jian-yong,
LIAO Yong-hong, SUN Di-an*

(Natural Medicinal Chemistry Research Center, Institute of Medicinal Plant Development,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the simultaneous determination of 15 pyrrolidine alkaloids (PAs) and their nitrogen oxides, and determine the content of the 15 PAs in the 15 batches of Farfarae Flos samples obtained from different sources, in order to understand the distribution status of these 15 PAs in Farfarae Flos from different sources, and provide relevant references for the safe and rational use of this medicinal materials. **Method:** The method was achieved by Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (3.0 mm × 150 mm, 1.8 μm) using a mobile phase made up of 0.05% formic acid and 2.5 mmol·L⁻¹ ammonium formate in water (A) -0.05% formic acid and 2.5 mmol·L⁻¹ ammonium formate in methanol (B). The flow rate and the injection volume were 0.4 mL·min⁻¹

[收稿日期] 20190428(006)

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2017-I2M-1-013)

[第一作者] 乔月, 在读硕士, 从事传统药材吡咯里西啶生物碱检测研究, Tel:010-57833298, E-mail: moon100107qy@163.com

[通信作者] * 孙迪安, 博士, 研究员, 从事天然药物化学研究, Tel:010-57833298, E-mail: diansun@sina.com

and 2 μL , respectively. The column temperature was 40 $^{\circ}\text{C}$. The instrument was Agilent 1290-6470 QQQ ultra high performance liquid chromatography-triple quaternary bar mass spectrometer. The components were detected in multiple reaction monitoring mode by mass spectrometry with ionization mode of ESI^+ . The content of the components measured in the samples was calculated by using the external standard method, and the difference between samples was analyzed based on RSD of different components. **Result:** The established method had a high sensitivity and good separation degree. The results of methodological investigation met the requirements. The results showed that all of the 15 batches of Farfarae Flos contained PAs and their nitrogen oxides. These PAs had almost the same types of structure. There were significant differences in the content and distribution of PAs in Farfarae Flos obtained from different sources. **Conclusion:** In general, Farfarae Flos contains pyrrolidine alkaloids and their nitrogen oxides. Senkirkine with a significant hepatotoxicity is the main compound. The content determination of PAs will provide scientific fundamentals for the safe and effective use of Farfarae Flos.

[**Key words**] Farfarae Flos; pyrrolizidine alkaloids; nitrogen oxides; senkirkine

款冬花为菊科款冬属植物款冬的干燥花蕾,始载于《神农本草经》,是止咳平喘方剂中的传统用药,临床上多用于治疗哮喘、慢性支气管炎等疾病^[1]。款冬植物主要分布于欧亚温带地区,在我国分布十分广泛。款冬花主要含有三萜皂苷、倍半萜、黄酮、生物碱、色原酮、绿原酸、挥发油等化学成分,具有一定的抗氧化、抗炎、抑制 α -葡萄糖苷酶、神经保护等作用^[2-4]。亦有部分东欧国家用款冬花或叶治疗感冒咳嗽、气管炎、支气管哮喘等症^[5-6]。

研究发现,已从款冬花中检出或分离得到吡咯里西啶生物碱(PAs)^[7-9]。其中,部分具有显著的肝脏毒性,可导致肝小静脉闭塞症,肝巨细胞症和肝纤维化坏死等^[10-11]。同时,PAs 类成分可经机体代谢活化形成毒性代谢物质,造成肝细胞功能紊乱、坏死,最终导致组织损伤^[12]。此外,其吡咯代谢物还能破坏 DNA 结构或形成 DNA 交联和 DNA 蛋白复合物,进而诱导基因突变乃至癌变^[13]。近年来,国内外均有报道,因服用含有吡咯里西啶类生物碱的食品(如蜂蜜、牛奶、茶叶)或间接食物污染,从而导致人畜中毒的事件发生^[14]。目前有关款冬花等传统中草药中该类成分的检测分析的相关研究报道较少,针对其中该毒性成分的检测不仅在一定程度上预防中毒事件的发生,也可以为药材安全使用的限量标准及合理使用的规范提供实验基础与参考。

PAs 类化合物紫外吸收弱,传统的 HPLC-UV 检测灵敏度较低,难以满足微量乃至痕量成分的检测分析,例如款冬花中千里光宁碱的质量分数约为 0.000 1%^[15]。报道发现,利用液质联用技术达到的灵敏度水平更高,可实现药材中 PAs 类的检测分

析研究。例如濮社班等^[16]采用 HPLC-ESI-MSⁿ 对不同来源款冬药材的 PAs 类成分进行定性检测,并在缺乏对照品的情况下分析相关 PAs 的结构与种类。目前有关款冬花中吡咯里西啶生物碱的研究仍存在不足之处;例如采用杂质干扰大、准确度低的比色法检测总生物碱的含有量,结果准确性存疑^[17],或所建立的定量分析方法灵敏度不高^[18]。由此可见,针对款冬花中的吡咯里西啶生物碱的检测,需要建立一种准确的定量分析方法,进一步研究其中可能含有的 PAs 含量与种类。且不同来源的款冬药材含有的 PAs 不同,其中的含量与种类均存在一定差别,需要进行具体分析与测定研究。故本实验对 15 批不同来源的款冬花样品进行 UPLC-MS/MS 测定,分析其中 PAs 及其相应氮氧化物的含量差异与分布现状,通过比较不同来源的样品中该类生物碱的含量与分布,为款冬花的毒性研究、安全用药和合理开发提供科学依据。

1 材料

1290-6470 QQQ 型超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国安捷伦 Agilent 公司);Agilent Eclipse Plus C_{18} 色谱柱(3.0 mm \times 150 mm, 1.8 μm);HC-800 型高速多功能粉碎机(永康市天祺盛世工贸有限公司);Q50 型 TGA 热重分析仪(美国 TA 仪器公司);ME104E 型 1/1 万电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];SC-3610 型低速离心机(安徽中科中佳科协仪器有限公司);KQ-500E 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司,超声功率 500 W,频率 40 kHz);SPE-M08 正压型多功能固相萃取装置(天津博纳艾杰尔科技有限公司);Cleanert PCX 固相萃取柱(500 mg/6 mL 30/pkg,天津博纳艾杰尔科技有限公司);液相微量进样针(瑞士 Hamilton

公司);移液枪(德国 Eppendorf 公司)。

甲醇、乙醇(北京化工厂,分析纯);乙腈、甲醇(美国 Fisher chemical,色谱纯);甲酸(美国 MREDA Technology Inc,色谱纯),甲酸铵(阿达玛斯试剂有限公司,RC 级,纯度 98%);浓硫酸(纯度 98%);浓氨水(纯度 28%);娃哈哈纯净水。

吡咯里西啶生物碱对照品分别为蓝蓟定,*N*-氧化蓝蓟定,欧天芥菜碱,*N*-氧化天芥菜碱,印美定碱,*N*-氧化印美定碱,石松胺,*N*-氧化石松胺,千里光宁碱,*N*-氧化千里光宁碱,千里光菲灵碱,*N*-氧化千里光菲灵碱,春千里光碱,倒千里光裂碱,克氏千里光碱(德国中草药 PhytoLab 公司,纯度均 $\geq 98\%$,批号分别为 12430, 12431, 12456, 11612, 10940,

12405, 12183, 12291, 11782, 11610, 11783, 11722, 10957, 12185, 11964)。

收集来自河北、内蒙古、甘肃、四川、山西 5 个省共 15 份不同产地、批次的款冬花药材,经中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员鉴定为菊科款冬属植物款冬 *Tussilago farfara* 的干燥花蕾或蜜炙品,样本保存于中国医学科学院药用植物研究所天然药物化学中心。采集地点包括各地药材市场、中药饮片药业有限公司以及日常药店等多种不同渠道,每份药材收集 100 ~ 500 g,充分干燥后除去多余花梗、叶片,使用高速粉碎机粉碎药材,过 60 目筛,得到 0.25 ~ 0.35 mm 的样品粉末。款冬花样品来源情况见表 1。

表 1 供试药材样品信息

Table 1 *Farfarae Flos* samples information

样品编号	产地	采集地点	采集时间/年月	样品编号	产地	采集地点	采集时间/年月
1	-	北京同仁堂	2017-10	9	甘肃	成都药材市场	2018-12
2	四川	安徽亳州药材市场	2017-10	10	-	安徽亳州药材市场	2018-12
3	河北	百草康神药业	2017-10	11	甘肃	荷花池药材市场	2019-01
4	河北张家口	安国中药材市场	2017-11	12	河北	荷花池药材市场	2019-01
5	内蒙古通辽	安国中药材市场	2017-11	13	河北	百草康神药业	2019-02
6	甘肃陇西	安国中药材市场	2017-11	14	-	北京同仁堂	2019-02
7(野生)	山西吕梁	安国中药材市场	2017-11	15(蜜炙)	-	北京同仁堂	2019-02
8	河北	大同老药工药店	2018-09				

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取各对照品约 1 mg,加乙腈溶解并定容至 10 mL 量瓶,得 100 mg·L⁻¹对照品储备母液,-20 ℃ 保存。用微量进样针取对照品储备母液各 100 μL 于 10 mL 量瓶中,甲醇定容,制得约 1 mg·L⁻¹ PAs 混合溶液,-20 ℃ 保存。对照品详细质量浓度见表 2。取 1 mg·L⁻¹ PAs 混合溶液适量稀释,配制成浓度梯度为 0.1,0.2,0.5,1,2,5,10,20,50,100,200,500 μg·L⁻¹ 的混合对照溶液,4 ℃ 保存。

2.1.2 供试品溶液 称取药材样品粉末约 2.0 g,置于 50 mL 锥形瓶中,加入甲醇 40 mL 润湿,密封后,振荡摇匀,室温下超声提取 30 min;5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液并浓缩至 1 mL 左右。加入 0.05 mol·L⁻¹ 硫酸溶液稀释样品溶液至 10 ~ 15 mL,进行 SPE-PCX 的富集纯化。具体流程为甲醇 5 mL 活化 SPE-PCX 小柱,0.05 mol·L⁻¹ 硫酸

溶液 5 mL 平衡小柱,将硫酸样品溶液 10 ~ 15 mL 上柱,甲醇 8 ~ 10 mL 淋洗除杂,8% 氨水-甲醇溶液 10 mL 洗脱,收集洗脱液并浓缩至 1 mL 左右。用 50% 甲醇-水稀释样品,定容至 2 mL 量瓶中,过 0.22 μm 微孔滤膜,取供试样品溶液 1 ~ 1.5 mL,稀释 200 倍后,取适量至液相小瓶中,供 UPLC-MS/MS 分析测定。

2.2 液相色谱与质谱条件

2.2.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(3.0 mm × 150 mm, 1.8 μm);流动相 A 相为含 0.05% 甲酸和 2.5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵的水溶液,B 相为含 0.05% 甲酸和 2.5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵的甲醇;梯度洗脱(0.5 ~ 1.0 min,5% ~ 20% B;1.0 ~ 8.5 min,20% ~ 37% B;8.5 ~ 10.0 min,37% ~ 80% B;10.0 ~ 11.0 min,80% ~ 95% B;11.0 ~ 12.5 min,95% B;12.5 ~ 13.0 min,95% ~ 5% B;13.0 ~ 16.0 min,5% B);流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,进样量 2 μL。

表 2 PAs 对照品储备液的质量浓度

Table 2 Mass concentration of pyrrolizidine alkaloids' solution

No.	对照品	分子式	称样量 /mg	储备液质量浓度 /mg·L ⁻¹	工作液质量浓度 /mg·L ⁻¹
1	<i>N</i> -氧化蓝蓟定	C ₂₀ H ₃₁ NO ₈	1.499 6	149.96	1.499 6
2	<i>N</i> -氧化天芥菜碱	C ₁₆ H ₂₇ NO ₆	1.585 9	158.59	1.585 9
3	印美定碱	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	1.083 9	108.39	1.083 9
4	<i>N</i> -氧化印美定碱	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	0.924 0	92.40	0.924 0
5	石松胺	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	1.334 4	133.44	1.334 4
6	<i>N</i> -氧化石松胺	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	0.994 6	99.46	0.994 6
7	千里光宁碱	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	1.005 3	100.53	1.005 3
8	<i>N</i> -氧化千里光宁碱	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	1.059 2	105.92	1.059 2
9	千里光菲灵碱	C ₁₈ H ₂₃ NO ₅	1.184 1	118.41	1.184 1
10	春千里光碱	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	1.317 7	131.77	1.317 7
11	克氏千里光碱	C ₁₉ H ₂₇ NO ₆	0.897 0	89.70	0.897 0
12	倒千里光裂碱	C ₈ H ₁₃ NO ₂	0.896 1	89.61	0.896 1
13	欧天芥菜碱	C ₁₆ H ₂₇ NO ₆	1.125 1	112.51	1.125 1
14	<i>N</i> -氧化千里光菲灵碱	C ₁₈ H ₂₃ NO ₆	1.090 0	109.00	1.090 0
15	蓝蓟定	C ₂₀ H ₃₁ NO ₇	10.980 0	1 098.00	1.098 0

注:15 号对照品的储备母液稀释 10 倍,再配制为约 1 mg·L⁻¹ 的工作浓度溶液。

2.2.2 质谱条件 带鞘流气的电喷雾离子源(AJS-ESI),离子化模式 ESI⁺;雾化气压力 275.79 kPa;雾化干燥气温度 300 ℃;气体流量 7 L·min⁻¹;鞘流气温度 325 ℃;鞘流气流量 11 L·min⁻¹;毛细管电压 3 500 V;质量扫描范围 *m/z* 0 ~ 500;质谱扫描方式多反应监测模式(MRM)。优化后 PAs 对照品的质谱参数见表 3。

2.3 方法学考察

2.3.1 方法专属性 取混合对照品溶液、供试样品溶液各 1 mL,在 2.2 色谱-质谱条件下检测,PAs 混合对照品与供试样品的 TIC 见图 1,混合对照品与样品溶液中各成分分离良好,在目标物对应色谱峰处均无干扰,且空白样品无干扰,表明该方法专属性较强。

2.3.2 线性关系与灵敏度 按 2.1.1 项下方法配制混合对照品溶液并稀释成标准曲线,在 2.2 项优化后的条件下进样检测;以峰面积积分值为纵坐标(*Y*),相应对照品质量浓度为横坐标(*X*),进行线性回归分析,得到线性回归方程;结果表明各 PAs 对照品在相应线性范围内的线性关系良好,其线性关

表 3 PAs 对照品优化后的条件参数

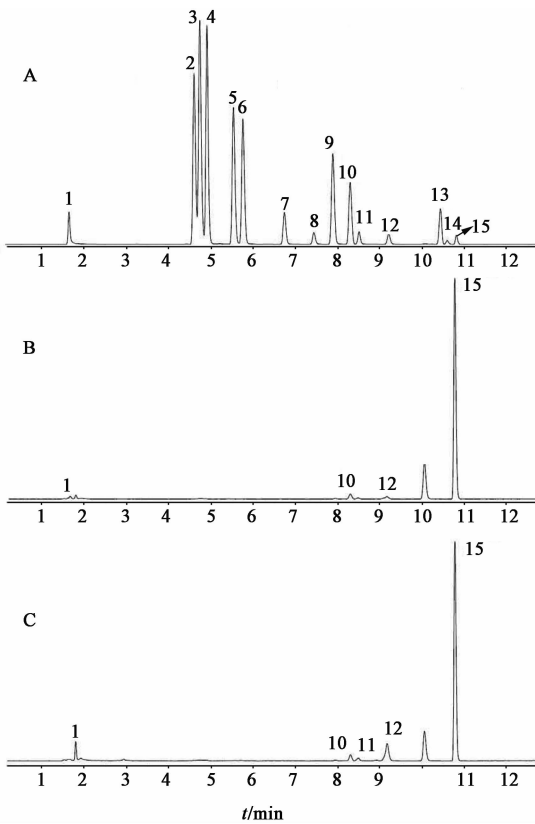
Table 3 Condition parameters of pyrrolizidine alkaloids

No.	对照品	扫描离子对(<i>m/z</i>)		碎裂电压 /V	碰撞能量 /V
		母离子 [M+H] ⁺	子离子		
1	<i>N</i> -氧化蓝蓟定	414.2	254.1 ¹⁾	152	33
		352.1	152	33	
2	<i>N</i> -氧化天芥菜碱	330.2	138.0 ¹⁾	149	29
		172.0	149	29	
3	印美定碱	300.2	138.0 ¹⁾	144	21
		156.0	144	33	
4	<i>N</i> -氧化印美定碱	316.2	172.0 ¹⁾	152	33
		138.0	152	33	
5	石松胺	300.2	138.0 ¹⁾	149	21
		156.0	149	33	
6	<i>N</i> -氧化石松胺	316.2	172.0 ¹⁾	149	29
		138.0	149	29	
7	千里光宁碱	336.2	120.1 ¹⁾	185	33
		138.0	185	33	
8	<i>N</i> -氧化千里光宁碱	352.2	118.0 ¹⁾	167	45
		136.0	167	37	
9	千里光菲灵碱	334.2	120.0 ¹⁾	162	29
		138.0	162	29	
10	春千里光碱	336.2	120.0 ¹⁾	177	33
		138.1	177	33	
11	克氏千里光碱	366.2	168.0 ¹⁾	157	33
		150.0	157	29	
12	倒千里光裂碱	156.2	112.0 ¹⁾	106	21
		108.1	106	21	
13	欧天芥菜碱	330.2	138.0 ¹⁾	131	21
		156.0	131	33	
14	<i>N</i> -氧化千里光菲灵碱	350.2	120.1 ¹⁾	154	37
		136.0	154	37	
15	蓝蓟定	398.2	120.0 ¹⁾	151	17
		220.0	151	17	

注:¹⁾ 为定量离子。

系与相关系数见表 4。以定量离子对的色谱峰信噪比 S/N≥3 对应的最低浓度为检测限(LOD),以定量离子对的色谱峰信噪比 S/N≥10 对应的最低浓度为定量限(LOQ),考察各 PAs 对照品的检测灵敏度,其具体结果见表 4。

2.3.3 精密度试验 取 3 个质量浓度水平(10,50,100 μg·kg⁻¹)的混合对照品溶液各 1 mL,在 2.2 项



1. 倒千里光裂碱; 2. 欧天芥菜碱; 3. 印美定碱; 4. 石松胺; 5. *N*-氧化印美定碱; 6. *N*-氧化石松胺; 7. 千里光菲灵碱; 8. *N*-氧化千里光菲灵碱; 9. *N*-氧化天芥菜碱; 10. 春千里光碱; 11. 千里光宁碱; 12. *N*-氧化千里光宁碱; 13. 蓝薊定; 14. *N*-氧化蓝薊定; 15. 克氏千里光碱

图 1 PAs 混合对照品 (A) 及供试样品 (B, C) TIC
Fig. 1 TIC of mixed PAs reference substances (A) and selected samples (B, C)

表 4 PAs 对照品的线性关系、线性范围、检测限及定量限

Table 4 Linear regression equation, linear ranges, LOD and LOQ of 15 pyrrolizidine alkaloids

No.	对照品	线性方程	R^2	线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	检测限 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	定量限 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
1	<i>N</i> -氧化蓝薊定	$Y = 395.608 8X - 151.346 4$	0.997 8	0.749 8 ~ 749.800 0	0.150 0	0.299 9
2	<i>N</i> -氧化天芥菜碱	$Y = 9 483.693 7X - 1 214.320 9$	0.998 6	0.317 2 ~ 317.180 0	0.158 6	0.317 2
3	印美定碱	$Y = 21 061.524 1X - 1 893.720 3$	0.998 2	0.216 8 ~ 541.950 0	0.010 8	0.108 4
4	<i>N</i> -氧化印美定碱	$Y = 17 709.571 2X - 2 023.628 6$	0.998 2	0.184 8 ~ 462.000 0	0.046 2	0.184 8
5	石松胺	$Y = 12 943.116 7X - 1 566.116 8$	0.998 6	0.266 9 ~ 667.200 0	0.013 3	0.133 4
6	<i>N</i> -氧化石松胺	$Y = 14 126.866 2X - 1 267.593 2$	0.997 9	0.198 9 ~ 497.300 0	0.049 7	0.198 9
7	千里光宁碱	$Y = 635.186 5X - 145.670 9$	0.995 9	0.502 7 ~ 201.060 0	0.100 5	0.502 7
8	<i>N</i> -氧化千里光宁碱	$Y = 1 079.041 5X - 140.255 6$	0.998 9	0.529 6 ~ 211.840 0	0.105 9	0.529 6
9	千里光菲灵碱	$Y = 2 674.309 7X - 243.627 0$	0.996 5	0.592 1 ~ 592.050 0	0.118 4	0.592 1
10	春千里光碱	$Y = 2 734.056 6X - 364.343 8$	0.997 9	0.263 5 ~ 263.540 0	0.065 9	0.263 5
11	克氏千里光碱	$Y = 1 132.238 2X + 332.834 2$	0.997 5	0.448 5 ~ 448.500 0	0.017 9	0.089 7
12	倒千里光裂碱	$Y = 2 996.727 2X - 780.726 9$	0.998 7	0.448 1 ~ 448.050 0	0.089 6	0.448 1
13	欧天芥菜碱	$Y = 2 2471.953 8X - 300.384 7$	0.997 3	0.112 5 ~ 562.550 0	0.011 3	0.112 5
14	<i>N</i> -氧化千里光菲灵碱	$Y = 1 363.913 9X - 230.079 0$	0.998 3	0.545 0 ~ 218.000 0	0.218 0	0.545 0
15	蓝薊定	$Y = 4 260.843 3X - 81.397 8$	0.996 0	0.219 6 ~ 549.000 0	0.054 9	0.219 6

条件下检测,同一浓度重复进样 6 次,分别计算各对照品峰面积 RSD 在 0.6% ~ 5.5%,表明仪器的精密度良好。

2.3.4 准确度试验 称取 9 份已知含量的空白样品粉末 1.0 g,分别精密加入一定量的各对照品溶液,按 2.1.2 项下方法制备加样回收率的供试品溶液,3 个质量浓度水平(10, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)各制备 3 份,在 2.2 项条件下进样分析,分别计算各对照品的平均回收率。

结果显示,其中 12 号对照品倒千里光裂碱在 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 水平的平均回收率为 68.10%,RSD 为 0.4%,9 号对照品千里光菲灵碱在 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 水平的平均回收率 69.65%,RSD 为 1.3%,略低于 2015 年版《中国药典》药品质量标准分析方法验证指导原则中的数据要求(待测成分质量分数 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 回收率在 70% ~ 125%)。其余 PAs 对照品的平均回收率在 71.52% ~ 105.96%,RSD 在 5.7% 以下,表明方法的回收率良好。

试验发现 12 号对照品倒千里光裂碱的平均回收率相较于其他对照品普遍偏低,可能原因为该对照品的出峰时间较早,保留效果欠佳。9 号对照品千里光菲灵碱仅在 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 水平的回收效果欠佳,可能原因为该浓度水平较低,检测过程中受到仪器状态与环境因素的一定影响。

2.3.5 重复性试验 称取 6 份 13 号款冬花样品粉末 2.0 g,按 2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试样品

溶液,按 2.2 项下条件进样分析,分别计算样品中各 PAs 峰面积 RSD 在 2.8% ~ 9.0%,表明方法的重复性良好。

2.3.6 基质效应考察 基质效应根据对检测信号影响不同分为基质增强效应和减弱效应。选取 3 种空白基质,制备 3 个质量浓度水平(50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)的混合对照品基质溶液,以其目标化合物的响应值与相应浓度标准曲线的响应值作比值;结果显示倒千里光裂碱的响应比在 28.92% ~ 52.96%,具有明显的基质减弱效应;*N*-氧化印美定碱的响应比在 120.85% ~ 143.50%,具有明显的基质增强效应;其余对照品响应比在 71.16% ~ 117.25%,表明无明显的基质效应影响,方法的纯化效果较好。

2.4 供试样品的测定 按照 2.1.2 项下方法制备供试样品溶液,按照 2.2 项下条件进行测定,采用外

标法计算各样品中 PAs 含量结果。

3 结果与分析

3.1 不同来源款冬花样品中 PAs 的含量与种类 共收集 15 个不同产地、批次的款冬花样品,对其中的 PAs 成分进行定量测定,结果表明,所有样品均含有 PAs,其中 7 号样品(山西吕梁野生)中 PAs 总检出量最低(26.93 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),6 号样品(甘肃陇西)中 PAs 总检出量最高(70.78 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),详细结果见表 5。实验发现为不同来源的样品中含有的 PAs 种类基本相同,均为克氏千里光碱,千里光宁碱及 *N*-氧化千里光宁碱,倒千里光裂碱以及春千里光碱。此外,样品 5 号(内蒙古通辽),7 号(山西吕梁野生),1 号(北京同仁堂)中检测到 *N*-氧化千里光菲灵碱,但由于含量低于其定量限,且不在相应线性范围内,无法进行定量分析。其余对照品在本实验中未被检测到。

表 5 15 批款冬花样品中 PAs 质量分数($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Contents of pyrrolizidine alkaloids in *Farfarae Flos*($\bar{x} \pm s, n=3$)

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

样品编号	克氏千里光碱	<i>N</i> -氧化千里光宁碱	千里光宁碱	春千里光碱	倒千里光裂碱	总检出量
1	40.59 ± 0.30	0.53 ± 0.05	0.23 ± 0.07	0.15 ± 0.02	0.31 ± 0.03	41.81 ± 0.29
2	47.92 ± 0.90	0.97 ± 0.15	0.18 ± 0.13	0.14 ± 0.04	0.30 ± 0.18	49.52 ± 1.14
3	56.00 ± 25.65	3.92 ± 0.98	0.40 ± 0.34	0.18 ± 0.13	0.34 ± 0.01	60.83 ± 27.09
4	44.16 ± 15.49	2.16 ± 0.50	0.43 ± 0.56	0.28 ± 0.22	0.32 ± 0.14	47.36 ± 16.90
5	47.33 ± 12.17	4.65 ± 1.82	0.67 ± 0.00	0.31 ± 0.06	0.28 ± 0.00	53.23 ± 13.93
6	68.77 ± 14.64	0.87 ± 0.39	0.39 ± 0.01	0.36 ± 0.11	0.39 ± 0.01	70.78 ± 15.12
7	25.65 ± 0.98	0.80 ± 0.10	0.09 ± 0.10	0.06 ± 0.03	0.34 ± 0.00	26.93 ± 1.15
8	43.59 ± 3.35	3.71 ± 0.53	0.29 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.30 ± 0.09	48.03 ± 4.03
9	63.43 ± 6.89	0.61 ± 0.67	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.05	0.38 ± 0.01	64.82 ± 7.49
10	37.62 ± 8.93	0.88 ± 0.18	0.15 ± 0.02	0.11 ± 0.10	0.28 ± 0.00	39.03 ± 8.64
11	44.76 ± 13.24	0.97 ± 0.30	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.07	0.30 ± 0.00	46.29 ± 13.64
12	53.93 ± 1.18	0.22 ± 0.34	0.21 ± 0.07	0.24 ± 0.02	0.30 ± 0.07	54.90 ± 1.49
13	28.97 ± 4.58	2.89 ± 0.47	0.11 ± 0.05	0.06 ± 0.03	0.29 ± 0.07	32.33 ± 4.55
14	36.49 ± 9.04	0.63 ± 0.08	0.19 ± 0.06	0.13 ± 0.03	0.31 ± 0.12	37.75 ± 9.06
15	33.50 ± 12.28	0.68 ± 0.41	0.35 ± 0.04	0.23 ± 0.07	0.31 ± 0.10	35.07 ± 12.67

3.2 不同 PAs 在款冬花样品中的含量与差异 本实验以 15 个 PAs 对照品,采用 MRM 模式进行同时测定,检测到中药款冬花中含有克氏千里光碱,千里光宁碱及 *N*-氧化千里光宁碱,春千里光碱,倒千里光裂碱以及 *N*-氧化千里光菲灵碱。其余 9 个 PAs 对照品在本实验中未被检测到。结果表明药材款冬花中 PAs 的含量与分布有较大差异。其中检出质

量分数最高的 PAs 成分为克氏千里光碱,25.65 ~ 68.77 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,占其样品 PAs 总检出量的 88.90% ~ 98.23%;其次质量分数较高的 *N*-氧化千里光宁碱,0.22 ~ 4.65 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,占其总检出量的 0.40% ~ 8.94%。这 2 种成分的含量占其样品中所测定成分总检出量的 97.48% ~ 98.80%。此外,千里光宁碱 0.09 ~ 0.67 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;春千里光碱 0.06 ~

0.36 mg·kg⁻¹; 倒千里光裂碱 0.28 ~ 0.39 mg·kg⁻¹; *N*-氧化千里光菲灵碱含量低于其定量限, 无法准确定量。具体结果见图 2。

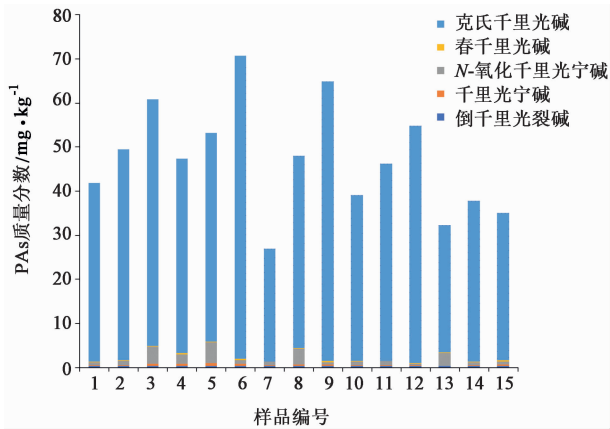


图 2 15 批款冬花样品中 PAs 的含量与差异

Fig. 2 Content and difference of pyrrolizidine alkaloids in *Farfarae Flos*

4 讨论

本实验运用 UPLC-MS/MS 技术同时测定不同来源的款冬花中 PAs 及其氮氧化物的含量, 实验方法参考文献[19]标准。实验过程中对提取溶剂、提取方式、富集纯化方法、稀释溶剂分别进行考察, 从而优化了制备方法。其中, 样品提取过程中考察甲醇、甲醇-硫酸溶液和硫酸溶液的提取效果, 最终选择对样品提取效果较好的甲醇作为溶剂, 采用超声提取的方式可节省时间且方便操作; 固相萃取中考察 3 种不同类型的固相萃取小柱, 最终选择 SPE-PCX 类型的小柱进行富集纯化, 并相应更改上样溶液与洗脱剂为硫酸溶液与氨水-甲醇溶液; 样品稀释溶解中考察甲醇和 50% 甲醇-水的检测效果, 最终选择后者为供试品检测的稀释溶液。与已有研究相比, 实验过程增加对 PAs 氮氧化物的检测分析, 并将测定时间缩短为 16 min, 检测到目标化合物的分离度与灵敏度良好, 方法学考察结果良好。故采用该方法对 15 批不同产地、批次的款冬花药材进行 PAs 含量测定, 结果表明 15 批款冬花药材中均含有 PAs 及其氮氧化物, 平均质量分数 47.25 mg·kg⁻¹。其中, 含量最高 PAs 为克氏千里光碱, 平均质量分数 44.85 mg·kg⁻¹, 占所测成分平均总量的 94.92%, 是款冬药材中最主要的 PAs 类成分; 其次为 *N*-氧化千里光宁碱, 平均质量分数 1.63 mg·kg⁻¹, 占所测成分平均总量的 3.45%。此 2 种成分的平均含量占所测 PAs 总量的 98% 以上。已有文献报道, 检测到中药款冬含有千里光宁碱、千

里光菲灵碱、克氏千里光碱^[20]; 其中, 克氏千里光碱质量分数在 19.5 ~ 46.6 mg·kg⁻¹, 千里光宁碱质量分数 < 1 mg·kg⁻¹^[21]。本次实验测得克氏千里光碱质量分数 25.65 ~ 68.77 mg·kg⁻¹; 千里光宁碱质量分数较低, 为 0.09 ~ 0.67 mg·kg⁻¹, 但其氮氧化物 (*N*-氧化千里光宁碱) 的质量分数相比其他 PAs 成分较高, 为 0.22 ~ 4.65 mg·kg⁻¹。此外, 实验中未检测到千里光菲灵碱, 仅在部分样品中检测出其氮氧化物 (*N*-氧化千里光菲灵碱), 推测 PAs 与其氮氧化物之间可能存在相互转化的现象。

从 15 批款冬花含量测定结果可以看出, 不同样品间 PAs 成分含量差异较大, RSD 在 10.5% ~ 88.8%, PAs 成分的总量也具有一定差异, RSD 为 26.0%。虽然各批次款冬药材中所含 PAs 种类基本相同, 但同一 PAs 成分在不同产地、批次的款冬花药材间存在明显差异。不同来源的药材由于生长环境与栽培方式而导致其含量存在客观差异, 实验收集的款冬花药材大多来自各地药材市场, 部分购自药店与药业公司, 在具体采集与加工处理过程中存在极大不确定性。因此, 有关不同来源药材中 PAs 含量差异大的原因仍需要深入研究。

目前, 大量研究证实, 克氏千里光碱、千里光宁碱、千里光菲灵碱等大环双酯的不饱和类 PAs 具有较强的肝脏毒性, 过量或长期摄入会导致急性或慢性肝损伤症状^[10-11]。已有实验表明, 款冬花的水煎液及总生物碱具有一定的肝脏毒性^[22]。而款冬花作为常用中药材, 特别在止咳化痰平喘的中成药制剂中使用十分频繁。临床观察发现, 加用款冬花散能够明显改善支气管扩张症急性加重期患者的症状, 值得临床推广使用^[23]。因此, 对其中 PAs 类毒性成分的有效检测与快速筛查显得尤为重要, 其安全用量与合理使用也是接下来研究与讨论的重点。本实验中建立的 UPLC-MS/MS 同时测定款冬花中 PAs 及其氮氧化物含量的方法灵敏准确、操作方便, 可用于不同来源款冬药材中 PAs 的检测分析及使用风险评估。另外, 本实验亦可为其他菊科药材中生物碱的分析检测研究提供参考依据。

【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, 2015: 332.
[2] GAO H, HUANG Y N, GAO B, et al. α -Glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. [J]. Food Chem, 2008, 106(3): 1195-1201.

- [3] Park H R, Yoo M Y, Seo J H, et al. Sesquiterpenoids isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L. inhibit diacylglycerol acyltransferase [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(22) : 10493-10497.
- [4] Joohee L, Kwangho S, Eugene H, et al. Neuroprotection against 6-OHDA toxicity in PC12 cells and mice through the Nrf2 pathway by a sesquiterpenoid from, *Tussilago farfara* [J]. *Redox Biol*, 2018, 18 : 6-15.
- [5] Smet P A G M D, Keller K, Hänsel R, et al. *Adverse Effects of Herbal Drugs* [M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1997.
- [6] XUE S Y, LI Z Y, ZHI H J, et al. Metabolic fingerprinting investigation of *Tussilago farfara* L. by GC-MS and multivariate data analysis [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2012, 41 : 6-12.
- [7] Nedelcheva A, Kostova N, Sidjimov A. Pyrrolizidine alkaloids in *Tussilago farfara* from Bulgaria [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2015, 29(sup1) : 1-7.
- [8] Pabreiter C M. Co-occurrence of 2-pyrrolidoneacetic acid with the pyrrolizidines tussilaginic acid and isotussilaginic acid and their 1-epimers in Arnica species and *Tussilago farfara* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(12) : 4135-4137.
- [9] 吴笛, 张朝凤, 张勉, 等. 中药款冬花的化学成分研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2008, 43(4) : 260-263.
- [10] 赵显国, 王峥涛, 张勉, 等. 肝毒吡咯里西啶生物碱与中草药 [J]. *中草药*, 1998, 29(5) : 341-346.
- [11] LIN G, WANG J Y, LI N, et al. Hepatic sinusoidal obstruction syndrome associated with consumption of *Gynura segetum* [J]. *J Hepatol*, 2011, 54(4) : 666-673.
- [12] TANG J, Akao T, Nakamura N, et al. *In vitro* metabolism of isoline, a pyrrolizidine alkaloid from *Ligularia duciformis*, by rodent liver microsomal esterase and enhanced hepatotoxicity by esterase inhibitors [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(10) : 1832.
- [13] XIA Q, CHOU M W, Kadlubar F F, et al. Human liver microsomal metabolism and DNA adduct formation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine [J]. *Chem Res Toxicol*, 2003, 16(1) : 66-73.
- [14] 张芳, 王长虹, 王峥涛. 植物中吡咯里西啶生物碱的检测与分析 [J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(6) : 1057-1063.
- [15] Roeder E. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids [J]. *Pharmazie*, 2000, 55(10) : 711-726.
- [16] 濮社班, 徐德然, 张勉, 等. 中药款冬中肝毒吡咯里西啶生物碱的 LC/MSⁿ 检测 [J]. *中国天然药物*, 2004, 2(5) : 293-297.
- [17] 王明芳, 李坤, 孟祥龙, 等. 款冬花炮制前后总生物碱含量比较 [J]. *中国药事*, 2015, 29(2) : 178-182.
- [18] CAO K, XU Y, MU X, et al. Sensitive determination of pyrrolizidine alkaloids in *Tussilago farfara* L. by field-amplified, sample-stacking, sweeping micellar electrokinetic chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(21) : 4243-4250.
- [19] BfR. Determination of pyrrolizidine alkaloids (PA) in plant material by SPE-LC-MS/MS [EB/OL]. https://www.bfr.bund.de/en/pyrrolizidine_alkaloids_pa_-192924.html, 2014-10-24/2019-04-26.
- [20] Luethy J, Zweifel U, Schlatter C, et al. Pyrrolizidine alkaloids in colts (*Tussilago farfara* L.) of various sources [J]. *Mitt Geb Lebensmittellunters Hyg Bern*, 1980, 71(1) : 73.
- [21] JIANG Z, LIU F, Goh J J L, et al. Determination of senkirkine and senecionine in *Tussilago farfara* using microwave-assisted extraction and pressurized hot water extraction with liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2009, 79(2) : 539-546.
- [22] 回连强, 高双荣, 刘婷, 等. 款冬花及其总生物碱的肝脏毒性 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4) : 238-241.
- [23] 钟云青, 许光兰, 王秀峰, 等. 款冬花散治疗支气管扩张症急性加重期痰热郁肺证的临床观察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(20) : 169-174.

[责任编辑 顾雪竹]