

罗布麻叶中肝毒性成分吡咯里西啶生物碱的含量分析及其初步风险评估

咎珂¹, 周颖², 李耀磊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. 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; 3. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要 目的: 对罗布麻叶中吡咯里西啶生物碱的含量进行测定, 并根据测定结果进行肝毒性初步风险评估。方法: 样品经过QuEChERS法提取后, 采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物的含量。结果: 6批罗布麻叶样品中印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物的含量范围分别为10.51~27.56、20.66~42.54、40.54~76.89和61.45~164.23 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。含量超过一些国家或组织的规定, 长期使用存在一定的安全风险。结论: 本研究所建立的方法为罗布麻叶中肝毒性成分吡咯里西啶生物碱的质量控制和安全性评价提供了科学依据。

关键词: 罗布麻叶; 肝毒性成分; 吡咯里西啶生物碱; 超高效液相色谱-串联质谱; 含量测定; 风险评估

中图分类号: R917; R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2021)07-0757-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2021.07.005

Content Analysis and Preliminary Risk Assessment of Hepatotoxic Components of Pyrrolizidine Alkaloids in *Apocyni veneti Folium*

Zan Ke¹, Zhou Ying², Li Yaolei³, Zuo Tiantian¹, Jin Hongyu¹, Wang Ying^{1*}, Ma Shuangcheng^{1*} (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Chinese Patent Medicine, Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 3. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Abstract Objective: To determine the content of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in *Apocyni veneti Folium*, and to carry out the preliminary risk assessment of hepatotoxicity based on the determination results. **Methods:** After QuEChERS extraction, the content of intermedine, lycopsamine, intermedine N-oxide and lycopsamine N-oxide were determined by the method of ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Results:** The content ranges of intermedine, lycopsamine, intermedine N-oxide and lycopsamine N-oxide in 6 batches of *Apocyni veneti Folium* were 10.51-27.56, 20.66-42.54, 40.54-76.89 and 61.45-164.23 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. These content have exceeded the regulations stipulated by some nations or organizations, and there exist certain safety risks in long-term use. **Conclusion:** The method established in this

基金项目: 科技部重大新药创制(编号 2018ZX09735-006)

作者简介: 咎珂, 博士, 副研究员; 研究方向: 中药质量研究; Tel: (010) 53852092; E-mail: 6206310@qq.com

通信作者: 马双成, 博士, 研究员; 研究方向: 中药质量研究; Tel: (010) 53852076; E-mail: masc@nifdc.org.cn

王莹, 博士, 副研究员; 研究方向: 中药质量研究; Tel: (010) 53852484; E-mail: wayi_1986@163.com

study will lay a scientific basis for the quality control and safety evaluation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in *Apocyni veneti Folium*.

Keywords: *Apocyni veneti Folium*; hepatotoxic components; pyrrolizidine alkaloids; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; content determination; risk assessment

罗布麻叶为夹竹桃科植物罗布麻 *Apocynum venetum* L. 干燥叶, 具有平肝安神、清热利水的功效, 用于肝阳眩晕、心悸失眠、浮肿尿少等疾病的治疗, 分布于我国新疆、青海、甘肃、陕西、山西、河南、河北、江苏、山东、辽宁及内蒙古等省区^[1-2]。现有罗布麻茶、罗布麻片、罗布麻胶囊等中成药使用罗布麻叶作为处方药材。罗布麻叶还被国家卫生健康委员会列入可用于保健食品的中药材之一^[3]。罗布麻叶主要含有黄酮、酚酸、生物碱等多类化合物^[4]。吡咯里西啶生物碱 (Pyrrolizidine Alkaloids, PAs) 广泛存在于菊科、紫草科、豆科、夹竹桃科等植物中, 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不良后果^[5-8]。Wang等^[9]建立超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法从罗布麻叶中鉴定出石松胺及其氮氧化物和印美定氮氧化物等肝毒性PAs成分并测定了含量。PAs成分在罗布麻叶中属于痕量水平, 供试品需采用固相萃取 (Solid Phase Extraction, SPE) 或QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)

法进行净化处理。采用SPE前处理操作较为复杂, 整个过程需要2~5 h。QuEChERS是近年来国际上最新发展起来的一种用于农产品检测的快速样品前处理技术, 原理与SPE相似, 都是利用吸附剂填料与基质中的杂质相互作用, 吸附杂质从而达到除杂净化的目的^[10]。采用QuEChERS进行样品前处理较为简便快捷, 整个操作过程仅需约30 min, 大大提高了检测效率。目前QuEChERS结合液质联用法检测中药材中PAs已经有报道^[11-13], 如Martinello等建立QuEChERS法结合液质联用技术测定了蜂蜜中9个PAs的含量。印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物均为1,2位不饱和的PAs (结构式见图1), 该类生物碱具有较强的肝毒性^[8], 是罗布麻叶中含量较高的4个PAs类成分。PAs在药材中一般为微量成分, 紫外吸收不强, 常规的液相色谱法往往难以检测, 液质联用法是PAs类成分测定的首选。本文建立超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法测定罗布麻叶中印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物4个PAs含量, 并根据测定结果进行初步的风险评估。罗布麻叶中存在印美定为首次发现并报道其含量。

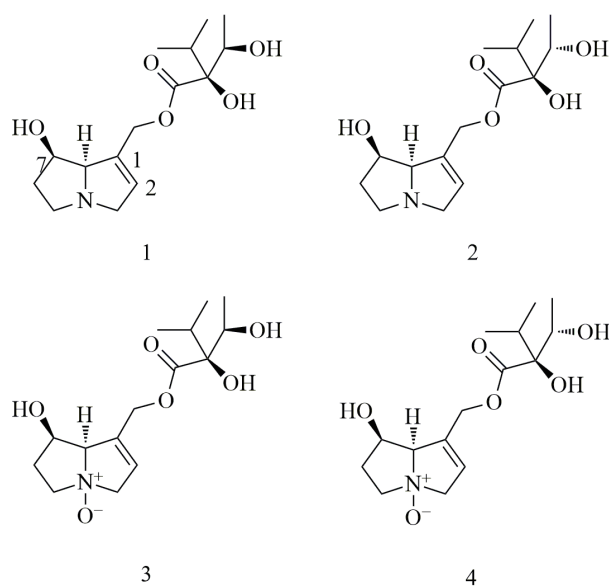


图1 印美定 (1)、石松胺 (2)、印美定氮氧化物 (3) 和石松胺氮氧化物 (4) 的结构式

1 仪器与材料

Waters Acquity™ UPLC色谱仪 (Waters公司); Waters Xevo TQ-S三重四极杆串联质谱检测器 (Waters公司); KQ-500DE型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); XS105DU十万分之一电子分析天平 (METTLER TOLEDO公司); Milli-Q超纯水系统 (Millipore公司)。

对照品: 印美定 (批号13420)、石松胺 (批号12183)、印美定氮氧化物 (批号13418) 和石松胺氮氧化物 (批号13484), 均购于PhytoLab GmbH公司。萃取盐包 (含硫酸镁4 g、氯化钠1 g、柠檬酸三钠1 g和半水柠檬酸氢二钠0.5 g, Agilent公司, 部件号5982-5650CH), 净化包 [含乙二胺-N-丙基硅烷 (PSA) 150 mg和硫酸镁900 mg, Agilent公司, 部件号5982-5056]。乙腈、甲醇、甲酸和甲酸铵均为质谱级 (Fisher公司), 水为超纯水。

罗布麻叶样品共6批 (编号分别标记为S1~S6), 分别采自江苏省、山东省等地, 经中国食品药品检定研究院中药民族药检定所金红宇主任药师鉴定为夹竹桃科植物罗布麻 *Apocynum venetum* L. 干燥叶。

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、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物的对照品适量, 分别以10%乙腈水配成质量浓度分别为0.988、1.012、0.976和

1.016 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一对照品储备液。分别精密称取各单一对照品储备液适量, 用10%乙腈水配成质量浓度分别为9.88、10.12、9.76和10.16 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液

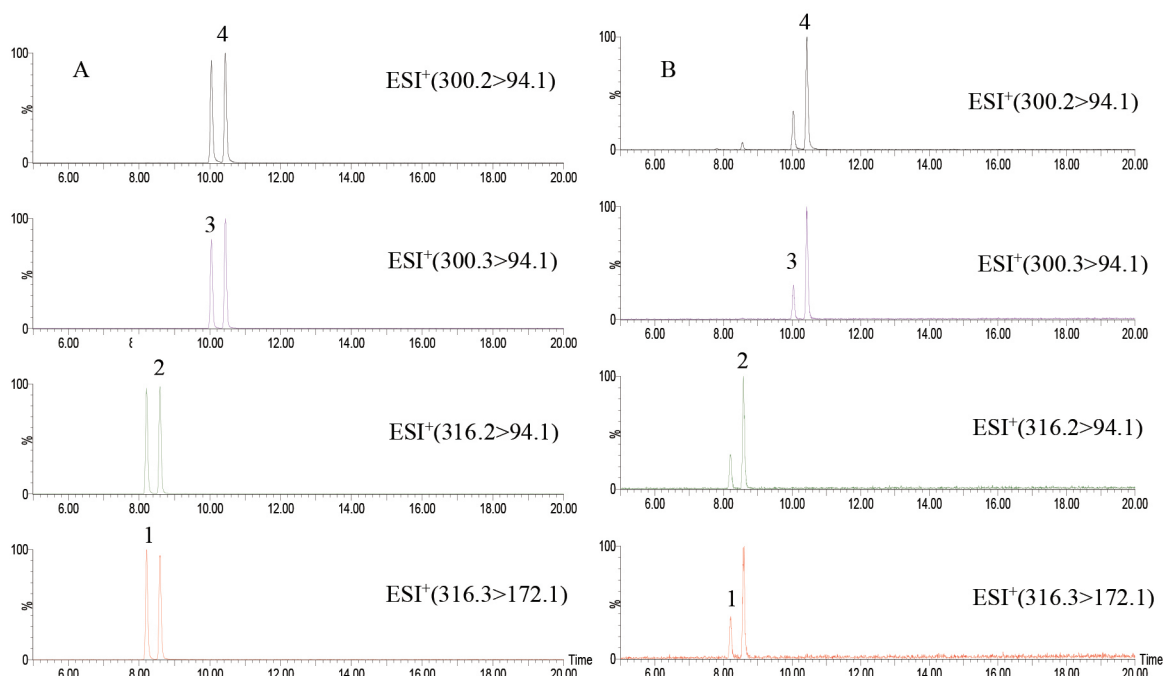
取罗布麻叶粉末 (过四号筛) 2.0 g, 置50 mL离心管中, 加10 mL 0.1%磷酸水溶液, 涡旋混匀, 加入10 mL乙腈, 加入萃取盐包, 涡旋1 min后, 8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min, 精密吸取上清液10 mL, 置15 mL离心管中, 加入净化包, 涡旋1 min后, 8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min, 取上清液5 mL, 40℃以下氮气吹干, 用10%乙腈水溶液溶解转移至5 mL量瓶中, 定容至刻度, 过0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱-质谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 柱温: 40℃; 流动相: 0.05%甲酸和2.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵的水溶液 (A) 及含0.05%甲酸和2.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵的乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~8 min, 3% \rightarrow 10%B; 8~20 min, 10%B); 流速: 0.3 mL $\cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: 1 μL ; 质谱离子源为电喷雾离子化源 (ESI), 正离子, 多反应监测模式 (MRM), 毛细管电压3.0 kV, 离子源温度150℃, 去溶剂温度500℃。4个PAs的质谱条件见表1, 对照品及样品的色谱图见图2。

表1 目标成分的MS参数

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
			定量离子	定性离子		
印美定	8.18	300.2	94.1	138.1	22	28
石松胺	8.51	300.3	94.1	138.1	26	30
印美定氮氧化物	10.11	316.2	94.1	172.1	30	36
石松胺氮氧化物	10.45	316.3	172.1	94.1	36	44



1. 印美定; 2. 石松胺; 3. 印美定氮氧化物; 4. 石松胺氮氧化物。

图2 混合对照品(A)和S1号样品(B)的MRM色谱图

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系、检测下限、定量下限考察

精密吸取各对照品储备液0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mL, 一一对应分别置于6个10 mL量瓶中, 加10%乙腈水定容至刻度, 摇匀, 即得各系列浓度的混合对照品溶液, 用0.22 μm 微孔滤膜过

滤, 取续滤液, 按照“2.2”项条件进样测定。以对照品的峰面积 Y 为纵坐标, 对应的浓度 X 为横坐标, 进行线性回归。以定量离子的色谱峰信噪比 $S/N \geq 3$ 对应的最低浓度为检测下限(LLOD), 以定量离子的色谱峰信噪比 $S/N \geq 10$ 对应的最低浓度为定量下限(LLOQ), 结果见表2。

表2 线性方程、线性范围、检测下限和定量下限

成分	线性方程	r	线性范围 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LLOD / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LLOQ / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
印美定	$Y = 10241X - 1087$	0.9991	0.988 ~ 98.8	0.20	0.49
石松胺	$Y = 9988X - 1253$	0.9992	1.012 ~ 101.2	0.20	0.51
印美定氮氧化物	$Y = 8645X - 1661$	0.9990	0.976 ~ 97.6	0.20	0.49
石松胺氮氧化物	$Y = 8842X - 1012$	0.9993	1.016 ~ 101.6	0.20	0.51

2.3.2 精密度试验

精密吸取“2.1.1”项的混合对照品溶液1 μL , 连续进样6次, 记录峰面积。结果印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物的平均峰面积($n=6$)分别为204126、317767、81785和184607, RSD分别为2.6%、2.8%、2.4%和2.1%,

表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验

取同一份供试品溶液(S1号样品), 分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定。结果印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物峰面积的RSD($n=6$)分别为1.8%、2.2%、2.4%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S1号样品的供试品溶液6份，分别进样测定。结果印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物的平均含量分别为10.51、20.66、49.45和105.66 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，RSD分别为3.8%、3.3%、3.5%和3.1%，表明该方法的重复性良好。

2.3.5 加样回收试验

分别精密量取“2.1.1”项下印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物的单一对照品储备液适量，分别加10%乙腈水配制成上述4个成分质量浓度依次为9.88、20.24、48.80和101.6 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的各单一对照品溶液。取已知含量的S1号样品的粉末6份，每份各约1.0 g，精密称定，分别置50 mL离心管中，精密加入上述4个单一对照品溶液各1.0 mL，再加入6 mL 0.1%磷酸水溶液，涡旋混匀，加入10 mL乙腈，加入萃取盐包，按照“2.1.2”项方法平行制备供试溶液，进样分析，计算回收率。结果印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物平均加

样回收率 ($n=6$) 分别为92.1%、88.2%、84.3%和93.4%，RSD分别为4.5%、4.1%、3.5%和3.3%。

2.4 含量测定

准确称取不同产地的罗布麻叶药材2.0 g，分别按照“2.1.2”项方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下进样测定，依据外标法计算印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物的含量，结果见表3。

3 风险评估

所测6批罗布麻叶样品中4个PAs的含量总和为149.73 ~ 287.01 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。现行标准^[1]规定罗布麻叶用量为6 ~ 12 g，因此，每日摄入量最低为0.90 μg ，最高为3.44 μg 。目前世界各国权威机构根据毒理学研究结果出台了一系列规定^[14-15]（见表4），虽然规定不完全一致，但都十分严格。罗布麻叶是可用于保健食品原料的中药材，我国暂未发布过食品和药品中PAs的限量规定。但参照表4中其他各国家或组织对PAs的规定，罗布麻叶中PAs的含量大多超过限量范围，长期使用可能存在一定的安全风险。

表3 样品含量测定结果（其中S1：n=6；S2 ~ S6：n=2）

批次	产地	印美定	石松胺	印美定氮氧化物	石松胺氮氧化物	总量
S1	江苏南京	10.51	20.66	49.45	105.66	186.28
S2	山东临沂	14.62	27.43	49.52	154.65	246.22
S3	甘肃兰州	27.56	34.67	60.55	64.23	187.01
S4	吉林四平	13.91	30.34	76.89	164.23	287.01
S5	内蒙古赤峰	22.52	25.22	40.54	61.45	149.73
S6	广西桂林	26.77	42.54	69.42	87.78	226.51

表4 不同国家或组织对PAs含量的规定

国家	出台时间	机构	限量规定	限制对象
德国	1992	联邦制药条例（FPO）	1 $\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ ，最长6周，对孕妇和哺乳期妇女零容忍	药品
	2011	联邦风险评估研究所（BfR）	0.007 $\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$	食物和饲料
英国	2008	毒性委员会（COT）	0.007 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ b.w. d}^{-1}$	所有来源
奥地利	1994	/	1 $\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$	药品
荷兰	2007	国家公共卫生与环境研究院（RIVM）	0.007 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ b.w. d}^{-1}$	药品和食品
欧洲	2016	欧洲药品管理局（EMA）	0.007 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ b.w. d}^{-1}$	药品
	2017	欧洲食品安全管理局（EFSA）	零容忍原则	食品和饲料

4 讨论

4.1 检测方法的选择

印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物等为罗布麻叶中最主要的PAs类成分，为痕量组分，高灵敏度的UPLC-MS/MS法检测为首选方法。本试验采用UPLC-MS/MS法同时测定正离子模式下4个成分的MRM离子对，定量离子峰形好，其他物质无干扰，能够对待测物质准确测定。

4.2 流动相的选择

由于所测4个化合物中为2组非对映异构体（组1：印美定和石松胺；组2：印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物），非对映异构体的分子离子峰和质谱裂解行为基本一致，需要通过色谱柱将其分开，通过调节梯度比例，在15 min内这2组非对映异构体均达到基线分离，最终确定流动相为含0.05%甲酸和2.5 mmol·L⁻¹甲酸铵的水溶液及含0.05%甲酸和2.5 mmol·L⁻¹甲酸铵的乙腈，梯度洗脱；在该系统下4个成分得到较好的保留和分离。

4.3 小结

本文采用建立的UPLC-MS/MS法可同时测定罗布麻叶中4个主要PAs的含量，方法简便、准确且重复性好。6个批次的罗布麻叶中4个PAs的含量测定结果表明印美定、石松胺、印美定氮氧化物和石松胺氮氧化物的含量范围分别为10.51~27.56、20.66~42.54、40.54~76.89和61.45~164.23 μg·kg⁻¹。风险评估提示可能存在一定的用药安全风险，应对该药肝毒性进行深入研究，进一步保障人民用药安全。

参考文献：

[1] 中国药典：一部[S]. 2020：220-221.
 [2] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志：第63卷[M]. 北京：科学出版社，1977：157-159.
 [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会：卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知[EB/OL]. [2021-04-24]. <http://www.nhc.gov.cn/zwgk/wtwj/201304/e33435ce0d894051b15490aa3219cdc4.shtml>.
 [4] 李庆华，魏春雁，李建东. 罗布麻叶药理作用及临床应用研究进展[J]. 中药材，2008，31（5）：784-787.
 [5] 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.

[6] 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.
 [7] 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.
 [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] Wang JC, Zhang M, Chen LH, 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.
 [10] Kim L, Lee D, Cho HK, et al. Review of the QuEChERS Method for the Analysis of Organic Pollutants: Persistent Organic Pollutants, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Pharmaceuticals[J]. *Trends Environ Anal*, 2019, 22: e00063.
 [11] Bolechová M, Čáslavský J, Pospíšalová M, et al. UPLC-MS/MS Method for Determination of Selected Pyrrolizidine Alkaloids in Feed[J]. *Food Chem*, 2015, 170: 265-270.
 [12] 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.
 [13] 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.
 [14] European Medicines Agency. Public Statement on Contamination of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products with Pyrrolizidine Alkaloids[EB/OL]. [2021-04-24]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_gb/document_library/public_statement/2016/06/wc500208195.pdf.
 [15] Ma CH, Yang L, Lin Z, et al. Determination and Regulation of Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids in Food: A Critical Review of Recent Research[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 119: 50-60.

（收稿日期 2021年5月24日 编辑 王雅雯）