

# 苍术麸炒前后吡咯里西啶生物碱含量变化研究

管珂<sup>1#</sup>, 周颖<sup>2#</sup>, 陈翠玲<sup>3</sup>, 王莹<sup>1</sup>, 李耀磊<sup>1</sup>, 金红宇<sup>1</sup>, 左甜甜<sup>1\*</sup>, 马双成<sup>1\*</sup> (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. 梧州市食品药品检验所, 梧州 543000)

**摘要** 目的: 建立苍术中吡咯里西啶生物碱(PAs)的含量测定方法, 考察麸炒前后5个PAs的变化规律。方法: 采用UPLC-MS/MS法进行含量测定, 采用ACQUITY UPLC HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液(体积比为11:89), 恒流洗脱, 流速 0.30 mL·min<sup>-1</sup>, 进样体积 1 μL; 电喷雾离子源, 正离子多反应监测模式, 以标准曲线法计算含量。结果: 3批苍术经过麸炒后, PAs总量从188.74~254.64 μg·kg<sup>-1</sup>下降到101.74~135.36 μg·kg<sup>-1</sup>; 野百合碱从25.35~52.18 μg·kg<sup>-1</sup>下降到23.25~37.41 μg·kg<sup>-1</sup>; 氮氧化野百合碱从25.12~40.22 μg·kg<sup>-1</sup>下降到6.98~18.23 μg·kg<sup>-1</sup>; 克氏千里光碱从11.64~36.25 μg·kg<sup>-1</sup>下降到3.64~12.85 μg·kg<sup>-1</sup>; 蓝蓟定从37.52~85.32 μg·kg<sup>-1</sup>下降到32.41~38.25 μg·kg<sup>-1</sup>; 氮氧化蓝蓟定从26.96~74.21 μg·kg<sup>-1</sup>下降到11.82~26.37 μg·kg<sup>-1</sup>。结论: 该方法可用于苍术中PAs的测定。麸炒后PAs总量和单个含量均有降低, 阐明了苍术麸炒解毒的科学内涵。

**关键词:** 苍术; 吡咯里西啶生物碱; 超高效液相色谱-串联质谱; 麸炒; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)03-0298-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.03.007

## Study on Content Changes of Pyrrolizidine Alkaloids in *Atractylodis Rhizoma* before and after Stir-frying with Wheat Bran

Zan Ke<sup>1#</sup>, Zhou Ying<sup>2#</sup>, Chen Cuiling<sup>3</sup>, Wang Ying<sup>1</sup>, Li Yaolei<sup>1</sup>, Jin Hongyu<sup>1</sup>, Zuo Tiantian<sup>1\*</sup>, Ma Shuangcheng<sup>1\*</sup> [1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine (Traditional Chinese Patent Medicine), Hangzhou 310052, China; 3. Wuzhou Institute for Food and Drug Control, Wuzhou 543000, China]

**Abstract Objective:** To establish a method for the determination of pyrrolizidine alkaloids (PAs) in *Atractylodis Rhizoma*, and investigate the changes of five PAs before and after stir-frying with bran. **Methods:** The content was determined by UPLC-MS/MS method. The chromatographic column ACQUITY UPLC HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm) was adopted. The mobile phase was eluted with acetonitrile-0.1% formic acid solution (11:89) at a constant flow rate of 0.30 mL·min<sup>-1</sup>, and the injection volume was 1 μL. Electrospray ion source was used in the mode of positive ion multi-reaction monitoring, the content by standard curve method

作者简介: 管珂 Tel: (010) 53852092; E-mail: 6206310@qq.com

共同第一作者: 周颖 Tel: (0571) 86459414; E-mail: zyayd@126.com

通信作者: 左甜甜 Tel: (010) 53851453; E-mail: zuotiantian2011@163.com

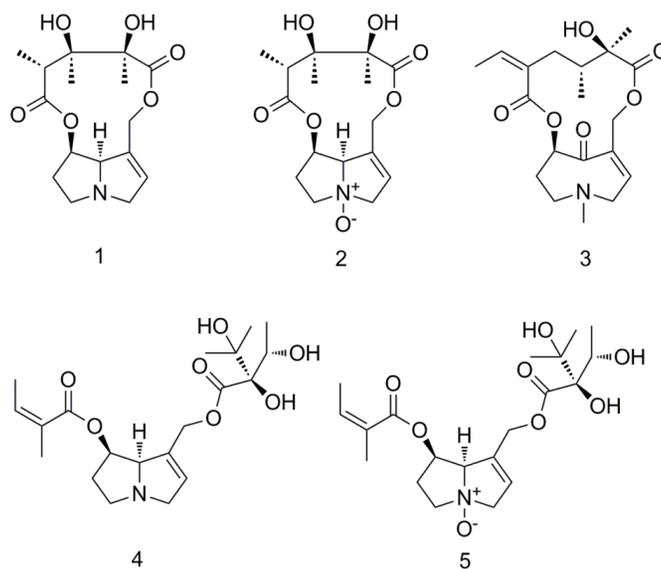
马双成 Tel: (010) 53852072; E-mail: masc@nifdc.org.cn

was calculated. **Results:** After three batches of *Atractylodes macrocephala* were fried with bran, the total amount of PAs ranged from 188.74 to 254.64  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  decreased to 101.74-135.36  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; monocrotaline from 25.35 to 52.18  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  decreased to 23.25-37.41  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; monocrotaline N-oxide ranged from 25.12 to 40.22  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  decreased to 6.98-18.23  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; senkirkine ranged from 11.64 to 36.25  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  decreased to 3.64-12.85  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; echimidine ranged from 37.52 to 85.32  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  decreased to 32.41-38.25  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; echimidine N-oxide ranged from 26.96 to 74.21  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  decreased to 11.82-26.37  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . **Conclusion:** This method could be used for the determination of PAs in *Atractylodis Rhizoma*. The total and individual content of PAs decreased after stir-frying with bran, which clarified the scientific connotation of the detoxification of the herb.

**Keywords:** *Atractylodis Rhizoma*; pyrrolizidine alkaloid N-oxides; UPLC-MS/MS; Stir-frying with Wheat Bran; content determination

苍术为常用中药材，来源于菊科苍术属植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 或北苍术 *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz. 的干燥根茎，具有燥湿健脾、祛风散寒的功效<sup>[1]</sup>。苍术性味苦、温、辛、烈，常用麸炒后入药，麸炒可以起到增强药效、缓和药性、降低毒性的作用<sup>[2-4]</sup>。苍术是国家卫生健康委员会公布的可用于保健食品的中药材之一<sup>[5]</sup>，其主要含有挥发油、倍半萜、聚炔等成分<sup>[6-10]</sup>，也含有痕量的吡咯里西啶生物碱类成分<sup>[11]</sup>。苍术麸炒前后化学成分的变化已有一些报道，主要研究的是聚炔、倍半萜等活性成分的变化规律<sup>[12-16]</sup>，对有毒成分的变化未见报道。本课题组筛选发现苍术中含有野百合碱 (Monocrotaline, Mc)、氮氧化野百合碱 (Monocrotaline N-oxide, McNO)、克氏千里光碱 (Senkirkine, Sk)、

蓝薊定 (Echimidine, Em) 和氮氧化蓝薊定 (Echimidine N-Oxide, EmNO) 5个吡咯里西啶生物碱 (Pyrrolizidine Alkaloids, PAs) (结构式如图1所示)。PAs是菊科植物中分布广泛的次生代谢产物，具有基因毒性和肝毒性，长期摄入可能导致肿瘤等疾病的潜在风险<sup>[17-19]</sup>。2020年12月，欧盟发布草药中PAs的最高限量为200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的规定，已于2022年7月1日正式执行，适用于包括草药在内的所有食品原料<sup>[20]</sup>。苍术中的PAs研究较少，麸炒前后PAs的变化尚无报道。本研究建立超高效液相色谱-串联质谱法 (Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, UPLC-MS/MS) 测定苍术药材麸炒前后5个PAs的含量，为该药材的安全性应用提供科学数据。



1. 野百合碱; 2. 氮氧化野百合碱; 3. 克氏千里光碱; 4. 蓝薊定; 5. 氮氧化蓝薊定。

图1 测定的5个吡咯里西啶生物碱的化学结构式

## 1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪：H-Class型（沃特世科技公司）；三重四极杆质谱仪：Xevo TQ-S型（沃特世科技公司）；超声波清洗器：P120H型（Elma公司）；电子天平：Quintix65-1CN型，感量为十万分之一（赛多利斯公司）。Oasis MCX固相萃取小柱（SPE柱，6 cc/150 mg，沃特世科技公司）。

苍术样品：共3批，分别采自江苏、河南和安徽等地，样品均经中国食品药品检定研究院中药所咎珂副研究员鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* 的干燥根茎。每批样品分为2份，一份为生品，分别标记为C1~C3；另一份按《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）2020年版四部0213炮制通则项下麸炒法加工为炮制品，分别标记为S1~S3。

对照品：野百合碱（批号111878-202003）由中国食品药品检定研究院提供；氮氧化野百合碱（批号13419）和氮氧化蓝萸定（批号12431）购于PhytoLab GmbH公司；克氏千里光碱（批号ZZS-21-X020-D6）和蓝萸定（批号ZZS19072901）购于上海甄准公司。甲醇、乙腈和甲酸均为质谱级（迪马公司）；水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

#### 2.1.1 混合对照品溶液

分别取5个PAs对照品约5 mg，精密称定，分别置5个100 mL量瓶中，加10%乙腈溶解并定容至刻度，得单一对照品储备液（I）。分别精密吸取上

述单一对照品储备液各0.2 mL置5个20 mL量瓶中，加10%乙腈稀释成每1 mL含Mc、McNO、Sk、Em和EmNO分别为524、492、508、482和514 ng的单一对照品储备液（II）。分别取上述单一对照品储备液（II）1 mL置同一50 mL量瓶中，加10%乙腈定容稀释成质量浓度分别为10.48、9.84、10.16、9.64和10.28 ng·mL<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

#### 2.1.2 供试品溶液

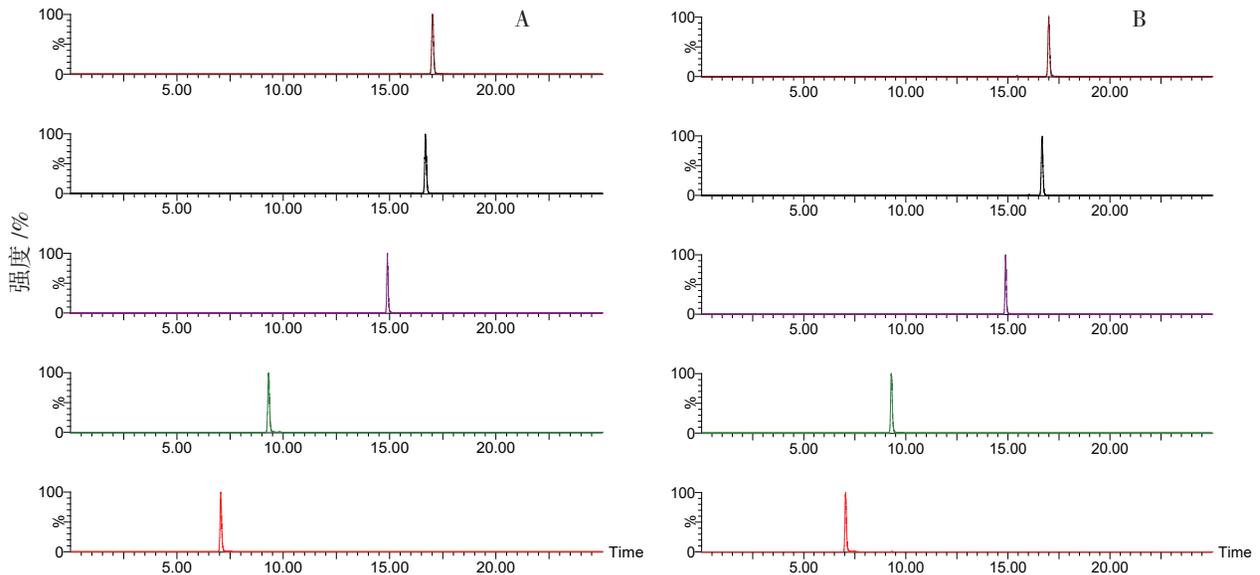
取苍术细粉2.0 g，精密称定，精密加入0.1%甲酸水溶液40 mL，超声（功率300 W，频率40 kHz）处理30 min，摇匀，过滤，取20 mL续滤液进行SPE萃取（SPE柱先用5 mL甲醇活化，再用5 mL 0.1%甲酸水溶液平衡后上样），待吸附后，先用10 mL甲醇洗脱，弃去该部分洗脱液，再用10 mL 8%氨水-甲醇水溶液洗脱，收集氨水-甲醇水溶液洗脱的流分，减压浓缩至约1 mL，加10%乙腈水溶液转移至2 mL量瓶中，用0.22 μm滤膜过滤，取续滤液，即得。

### 2.2 色谱-质谱条件

采用Acquity UPLC HSS T3（150 mm×2.1 mm，1.8 μm，沃特世公司）色谱柱；柱温40℃；流动相乙腈-0.1%甲酸水溶液（体积比为11:89）；洗脱方式为恒流洗脱；流量0.30 mL·min<sup>-1</sup>；进样体积1 μL；电喷雾离子源：正离子多反应监测模式；毛细管电压3.0 kV；离子源温度150℃；去溶剂温度500℃。5个PAs的质谱条件见表1，对照品和样品的色谱图见图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	碰撞电压/V
			定量离子	定性离子		
Mc	7.06	326.2	120.1	237.2	14	32
McNO	9.30	342.2	137.2	119.2	20	24
Sk	14.90	366.3	150.1	220.2	18	24
Em	14.69	398.2	120.1	220.1	32	26
EmNO	17.03	414.2	254.2	352.2	24	28



1. 野百合碱; 2. 氮氧化野百合碱; 3. 克氏千里光碱; 4. 蓝薊定; 5. 氮氧化蓝薊定。

图2 对照品混合溶液 (A) 和样品 (B) MRM 图

2.3 线性关系考察及检测限、定量限的检测

精密吸取Mc、McNO、Sk、Em和EmNO的单一对照品储备液各0.1、0.2、0.5、1.0、2.0和5.0 mL，一一对应分别置于6个50 mL量瓶中，加10%乙腈水溶液稀释至标线，摇匀，即得系列混合对照品工作溶液。按照“2.2”项下条件进样测定。以对照品的色谱峰面积 (Y) 为纵坐标，5个PAs对应的质量

浓度 (X) 为横坐标，进行线性回归。以3倍定量离子色谱峰信噪比对应的最低质量浓度为检测限 (Limit of Detection, LOD)，以10倍定量离子色谱峰信噪比对应的最低浓度为定量限 (LOQ)，结果见表2。由表2可知，5个PAs在各自的质量浓度范围内与色谱峰面积线性关系良好。

表2 线性方程、线性范围、检测限和定量限

成分	线性方程	r	线性范围/(ng · mL <sup>-1</sup> )	LOD/(ng · mL <sup>-1</sup> )	LOQ/(ng · mL <sup>-1</sup> )
Mc	Y = 3586X - 582	0.9991	1.048 ~ 52.4	0.21	0.52
McNO	Y = 7851X - 896	0.9993	0.984 ~ 49.2	0.20	0.49
Sk	Y = 9634X - 1012	0.9994	1.016 ~ 50.8	0.20	0.51
Em	Y = 10268X - 956	0.9992	0.964 ~ 48.2	0.19	0.48
EmNO	Y = 13622X - 1874	0.9994	1.028 ~ 51.4	0.21	0.51

2.4 精密度试验

精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液1 μL，连续进样6次，记录峰面积。结果显示，5个PAs的平均峰面积的RSD (n=6) 均小于3.0%，表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

精密称取样品粉末 (编号C1)，按“2.1.2”项下方法制备，分别于0、4、8、12、24 h进样测定。结果显示，5个PAs色谱峰面积测定结果的RSD (n=6) 均小于3.0%，表明供试品溶液在24 h

内稳定。

## 2.6 重复性试验

取样品粉末(编号C1),按“2.1.2”项下方法处理,平行制备供试品溶液6份,分别进行测定,计算各PAs的含量。结果Mc、McNO、Sk、Em和EmNO的含量分别为25.42、40.31、11.56、48.33和63.29  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,RSD( $n=6$ )分别为3.5%、3.2%、3.9%、2.9%和3.4%,说明该方法重复性较好,能够达到测定要求。

## 2.7 加样回收率试验

分别精密量取“2.1.1”项下5个单一对照品储备液(II)各0.5、1.0、0.2、1.0、1.2 mL置同一10 mL量瓶中,加10%乙腈水配制含Mc、McNO、

Sk、Em和EmNO质量浓度依次为26.2、49.2、10.2、48.2和61.7  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。取C1号样品的粉末6份,每份约1.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,分别精密加入上述混合对照品溶液1.0 mL,按“2.1.2”项下方法制备供试溶液,按“2.2”项下条件进样分析,计算回收率,结果5个PAs的加样回收率在83%~94%,RSD小于5.0%,说明各成分回收率良好。

## 2.8 样品测定

分别取炮制前后苍术各批次样品2.0 g,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下条件进样测定,按标准曲线法计算各成分的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果( $n=2$ )

产地	加工方法	编号	含量 / ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )					总量 / ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
			Mc	McNO	Sk	Em	EmNO	
江苏南京	生品	C1	25.35	40.22	11.64	48.41	63.12	188.74
	麸炒	S1	23.25	10.23	3.64	38.25	26.37	101.74
安徽宿州	生品	C2	33.74	25.12	36.25	85.32	74.21	254.64
	麸炒	S2	28.12	6.98	7.52	76.35	16.39	135.36
河南商丘	生品	C3	52.18	38.18	35.28	37.52	26.96	190.12
	麸炒	S3	37.41	18.23	12.85	32.41	11.82	112.72

## 3 讨论与结论

### 3.1 液相色谱条件的选择

考察了Acquity UPLC HSS T3(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ )、Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )和ZORBAX SB C<sub>18</sub>(50 mm $\times$ 4.6 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ )色谱柱,结果表明3种色谱柱经调节流动相比比例均能实现5个PAs的分离,但第1种色谱柱可以在恒流洗脱,故选择该柱进行测定。

检测目标成分PAs为生物碱,在流动相中添加少量甲酸后易于化合物的电离,适合质谱检测。同时考察了水相和有机相的洗脱比例,5个化合物在20 min内能够达到基线分离。

### 3.2 质谱条件的选择

PAs生物碱在溶液中呈阳离子状态,故采用正离子模式检测。采用全扫描模式获得化合物丰度最

大的子离子作为定量离子,次强的离子作为定性离子,并对定量离子和定性离子的锥孔电压和碰撞电压进行优化,结果见表1。

### 3.3 样品溶液制备条件优化

苍术中含有大量的黄酮和色素等成分,PAs为痕量成分,采用0.1%甲酸水溶液可提取出生物碱类成分,减少色素等的溶出。阳离子交换固相萃取小柱可去除非离子型成分,易于富集阳离子型生物碱化合物,待测成分易于浓缩和测定。

### 3.4 含量结果分析

3批苍术药材经过麸炒后,PAs总量从188.74~254.64  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 下降到101.74~135.36  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,下降了40.71%~46.84%;Mc从25.35~52.18  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 下降到23.25~37.41  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,下降比例为8.28%~28.31%;McNO

从25.12 ~ 40.22  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 下降到6.98 ~ 18.23  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 下降52.25% ~ 74.56%; Sk从11.64 ~ 36.25  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 下降到3.64 ~ 12.85  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 下降比例为63.58% ~ 79.26%; Em从37.52 ~ 85.32  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 下降到32.41 ~ 38.25  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 下降比例为10.51% ~ 20.99%; 氮氧化蓝萆定从26.96 ~ 74.21  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 下降到11.82 ~ 26.37  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 下降比例为56.16% ~ 77.91%。麸炒前后相比, 苍术中5个PAs均有不同程度的降低, 氮氧化野百合碱和氮氧化蓝萆定2个氮氧化PAs下降更为明显, 而对应的PAs则下降较少, 可能是因为氮氧化物更不稳定, 部分转变为对应的PAs所致。3批生品PAs总量接近或超过欧盟200  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的规定, 但麸炒后均符合规定。

### 3.5 结论

本文建立了苍术中PAs的UPLC-MS/MS测定方法, 并比较了麸炒前后Mc、McNO、Sk、Em和EmNO 5个PAs的含量变化。该方法经方法学验证符合定量检测的要求, 可用于苍术中PAs的测定。麸炒后PAs总量和单个含量均有降低, 阐明了苍术麸炒解毒的科学内涵。

### 参考文献:

[1] 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020: 168-169.

[2] 石坤, 涂济源, 徐依依, 等. 多指标综合评价法优化麸炒苍术的炮制工艺[J]. 中国药师, 2019, 22(3): 394-398.

[3] 马嘉擎, 赵小雨, 刘艳艳, 等. 麸炒中药现代研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(2): 163-166.

[4] 杨栋, 陈悦梅, 吴晓磊, 等. 苍术炮制前后指纹图谱及主要成分含量变化研究[J]. 中国药师, 2020, 23(12): 2398-2402.

[5] 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[R/OL]. (2002-03-11) [2022-08-11]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/gfxwj/201304/e33435ce0d894051b15490aa3219cdc4.shtml>.

[6] 周媛媛, 高蕙蕊, 张然然, 等. 关苍术化学成分的研究[J]. 中成药, 2020, 42(10): 2640-2643.

[7] 赵千里, 王美娟, 赵敏, 等. 关苍术的研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(16): 3797-3803.

[8] 邓爱平, 李颖, 吴志涛, 等. 苍术化学成分和药理的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3904-

3913.

[9] 周洁, 汤维维, 陈君. 基于UPLC-QTOF-MS/MS法的茅苍术与北苍术化学成分分析[J]. 药学与临床研究, 2020, 28(5): 321-328.

[10] 赵晋, 邓金宝, 黎雄, 等. 苍术聚炔类化学成分研究[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(4): 525-528.

[11] 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.

[12] 涂济源, 刘艳菊, 肖波, 等. 苍术麸炒前后正丁醇部位燥湿健脾药效及关键成分研究[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 2949-2953.

[13] 洪婉敏, 陈丹燕, 纪玉华, 等. 北苍术麸炒前后指纹图谱与色度值的差异研究[J]. 中药材, 2021, 44(2): 328-333.

[14] 许安安, 李水清, 涂济源, 等. 苍术麸炒前后氯仿部位化学成分研究[J]. 中药材, 2015, 38(1): 62-64.

[15] 刘玉强, 才谦, 贾天柱. 麸炒前后苍术中3种成分的HPLC测定[J]. 中成药, 2013, 35(1): 131-135.

[16] 陈祥胜, 容艳芬, 刘苗苗, 等. 苍术麸炒前后的专属性HPLC特征指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(19): 23-26.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 吴艳, 刘炳林. 含吡咯里西啶类生物碱的中药安全性考虑[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(23): 3954-3956.

[20] European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety. Commission Regulation (EU) 2020/2040 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as Regards Maximum Levels of Pyrrolizidine Alkaloids in Certain Foodstuffs[R/OL]. (2020-12-11) [2022-08-11]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R2040&qid=1634390330940&from=EN>.

(收稿日期 2022年6月13日 编辑 郑丽娥)