

DPiMS-8060 快速筛查和定量分析中草药中的吡咯里西啶类生物碱

DPiMS-002

摘要：本文基于岛津 DPiMS-8060 建立了中草药中吡咯里西啶类生物碱的快速筛查和定量分析方法。在两种模型中药（千里光和紫菀）中均未检测到野百合碱，因此以野百合碱作为内标。在 20s 内，可以完成 9 种化合物（阿多尼弗林碱，野百合碱 -N- 氧化物，倒千里光碱，千里光菲灵碱，千里光宁碱，毛果天芥菜碱，千里光宁碱 -N- 氧化物，千里光菲灵碱 -N- 氧化物，克氏千里光碱）的定性定量分析。阿多尼弗林碱的线性范围为 0.09-4.6ppb，其余化合物的线性范围 0.20ppb-50ppb，并且所有化合物的线性相关系数都大于 0.99。检出限为 0.04-0.37 $\mu\text{g/g}$ ，定量限为 0.11-1.10 $\mu\text{g/g}$ ，标准样品 7 次平行测定的相对标准偏差低于 13.8%，精密度较好。其中 8 中化合物的加标回收率在 60-120% 之间，准确性好。采用 LC-MS/MS 法验证，DPiMS-8060 的准确率在 78% 以上。该方法快速、重现性好、灵敏度高，适用于中草药和中成药中吡咯里西啶类生物碱的快速筛查和定量分析。





关键词：吡咯里西啶 生物碱 DPiMS-8060 千里光 紫菀 快速筛查 定量分析

吡咯里西啶类生物碱 (PAs) 是一类分布广泛的植物毒素，大部分具有肝毒性。随着人们对 PAs 毒性认识的不断深入，规定的 PAs 摄入量也越来越严格。2001 年，欧洲食品安全管理局提出食品中 PAs 的每日摄入量应低于 70 $\mu\text{g/kg}$ ；而 2014 年，欧洲药品管理局要求所有来源的短期口服药中的 PAs 的日摄入限值为 0.005 $\mu\text{g/kg}$ （按平均体重 65kg）。千里光作为一种常见的中草药，含有较多的阿多尼弗林碱 (adonifoline)。中国药典 (2015 版) 规定千里光中的阿多尼弗林碱含量应低于 0.004% (40 $\mu\text{g/g}$)。PAs 广泛存在于草药、茶叶、谷物中，可以通过食物链传递。因此，迫切需要开发一种快速筛查方法来有效地监测其含量。

目前，主要通过 LC-MS/MS 和 LC-QTOF 对 PAs 进行鉴定和分析。前处理和色谱分析需要较长的时间。

DPiMS-8060 由探针电喷雾电离源 (PESI) 和 LCMS-8060 组成。PESI 不需要流动相、雾化气和干燥气。PESI 也可以连接到 LCMS-8045 以上型号的三重四极杆质谱仪上。DPiMS-8060 已用于动物药、农药、生物毒素和代谢组学的研究中。高灵敏度、高选择性、超短的分析时间使 DPiMS-8060 成为一种快速筛查的有力工具。

本应用基于 DPiMS-8060 采用内标法 (野百合碱) 建立了千里光和紫菀中吡咯里西啶类生物碱的快速筛查和定量分析方法。通过 LC-MS/MS 法对 DPiMS-8060 的结果进行验证。该方法简便、灵敏、准确，适用于中草药和中成药中吡咯里西啶类生物碱的快速筛查和定量分析。

	Plant	Dry herbs
S.cannabifolii (紫菀)		
S. scandentis (千里光)		

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津公司的快速原位离子化检测仪器 DPiMS-8060。具体配置为：探针电喷雾离子源（PESI），LCMS-8060 三重四级杆质谱仪，LabSolutions Ver.5.96 工作站。金属探针在使用之前采用放电 - 充电循环程序进行老化。

1.2 样品制备

样品经超声提取、离心和稀释后，直接进行分析。

具体步骤如下：

1. 准确称取 0.20 g 样品于 50 mL 离心管；
2. 加入 10 mL 甲醇（0.1% 甲酸），称重，超声提取 40min；
3. 然后用甲醇（0.1% 甲酸）补足损失的重量；
4. 混合液在 4000rpm 离心 10min；
5. 取 50.0 μ L 上清液用乙醇 / 水（60/40，v/v，0.1% 甲酸）稀释至 1 mL；
6. 取 9.0 μ L 稀释液进样分析。

1.3 分析条件

离子源条件：

取样时间：50 msec

放电电压：2.3 kV(+)/-3.0 kV(-)

取样位置：46.0 mm

探针清洗：0.05min(+)/0.05min(-)

离子化时间：220 msec

探针频率：2.78 Hz

质谱条件：

离子源：PESI (+)

DL 温度：250 $^{\circ}$ C

加热块温度：30 $^{\circ}$ C

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

化合物名	m/z	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
野百合碱 N- 氧化物	342.15 > 137.10*	-17.0	-29.0	-25.0
	342.15 > 120.15	-10.0	-35.0	-24.0
阿多尼弗林碱	366.15 > 338.05*	-10.0	-28.0	-23.0
	366.15 > 94.10	-10.0	-41.0	-16.0
倒千里光碱	352.20 > 120.10*	-20.0	-30.0	-20.0
	352.20 > 138.10	-12.0	-31.0	-22.0
千里光菲灵碱	334.15 > 120.10*	-17.0	-29.0	-12.0
	334.15 > 94.10	-16.0	-36.0	-18.0
千里光宁碱	336.20 > 120.15*	-10.0	-28.0	-23.0
	336.20 > 94.15	-10.0	-36.0	-17.0
毛果天芥菜碱	412.25 > 109.10*	-20.0	-35.0	-20.0
	412.25 > 114.05	-20.0	-30.0	-20.0
千里光宁 N- 氧化物	352.15 > 94.15*	-14.0	-47.0	-18.0
	352.15 > 118.15	-13.0	-31.0	-23.0
千里光菲灵 N- 氧化物	350.15 > 94.15*	-13.0	-43.0	-18.0
	350.15 > 120.15	-13.0	-33.0	-14.0
克氏千里光	366.20 > 168.15*	-14.0	-29.0	-18.0
	366.20 > 150.15	-14.0	-27.0	-16.0
内标 (野百合碱)	326.15 > 120.15*	-16.0	-37.0	-24.0
	326.15 > 121.15	-12.0	-30.0	-23.0

* 为定量离子

结果与讨论

2.1 标准样品 MRM 色谱图

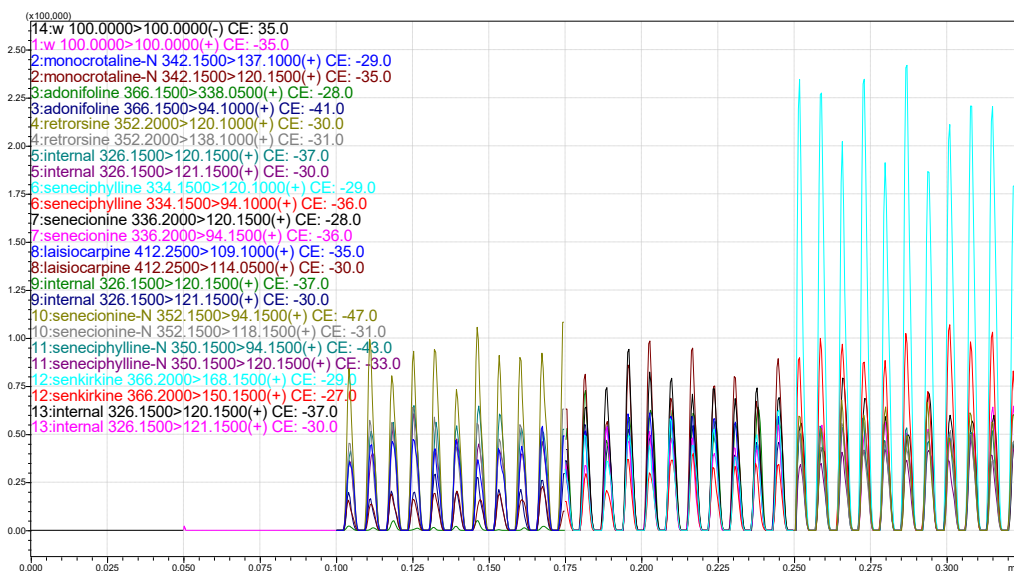


图 1 标准样品的 MRM 色谱图 (10.0 µg/L)

2.2 线性范围

按照 1.3 节的分析条件分析了 9 种吡咯里西啶碱。9 种化合物的回归方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限见表 3。阿多尼弗林碱采用外标法，校正曲线相对系数大于 0.99，线性范围为 0.092-4.6ppb。其它化合物，采用内标法（野百合碱），相关系数均大于 0.999，线性良好。

表 3 目标化合物的标准曲线回归方程、相关系数、线性范围和定量限

化合物名	回归方程	r^2	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	检出限 ($\mu\text{g/g}$)	定量限 ($\mu\text{g/g}$)
野百合碱 N-氧化物	$Y = 0.393X + 0.008$	0.999	0.2-50	0.22	0.66
阿多尼弗林碱	$Y = 18820.0X - 5.759$	0.996	0.092-4.6	0.04	0.11
倒千里光碱	$Y = 0.737X + 0.000$	0.999	0.2-50	0.27	0.80
千里光菲灵碱	$Y = 0.368X + 0.004$	0.999	0.2-50	0.24	0.73
千里光宁碱	$Y = 0.532X + 0.017$	0.999	0.2-50	0.37	1.10
毛果天芥菜碱	$Y = 0.386X + 0.027$	0.999	0.2-50	0.28	0.85
千里光宁 N-氧化物	$Y = 0.442X + 0.010$	0.999	0.2-50	0.22	0.67
千里光菲灵 N-氧化物	$Y = 0.401X - 0.003$	0.999	0.2-50	0.23	0.69
克氏千里光	$Y = 1.566X + 0.050$	0.999	0.2-50	0.34	1.02

2.3 精密度

在两个浓度水平上进行七次平行测量后，用相对标准偏差对方法的精密度进行评价。在低浓度时，7 次测量的 RSD 为 7.7%-13.8%；在高浓度时，7 次测量的 RSD 为 2.1%-6.4%。结果表明，所有化合物均具有良好的精密度。

表 4 标准样品检测及重复性结果

化合物名	加标 ($\mu\text{g/L}$)	平行测定							均值 ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6	7		
野百合碱 N-氧化物	1.00	0.81	0.68	0.85	0.72	0.68	0.83	0.79	0.76	9.20
	30.0	22.6	25.0	23.6	22.2	22.7	23.2	24.8	23.4	4.60
	0.09	0.07	0.09	0.06	0.08	0.08	0.07	0.06	0.07	15.6
阿多尼弗林碱	2.3	1.83	2.14	2.28	2.05	2.08	2.15	2.13	2.09	6.5
	1.00	0.67	0.73	0.53	0.68	0.72	0.81	0.70	0.69	12.3
	30.0	22.0	24.4	22.6	22.2	22.0	22.7	23.3	22.7	3.80
倒千里光碱	1.00	0.92	0.80	0.94	0.88	1.01	0.81	0.83	0.88	8.80
	30.0	26.2	28.5	26.8	28.5	28.1	26.3	25.6	27.2	4.50
	1.00	0.93	0.67	0.79	0.92	0.73	0.92	0.98	0.85	13.8
千里光菲灵碱	30.0	27.5	29.2	29.1	30.0	29.0	27.6	27.7	28.6	3.40
	1.00	0.71	0.49	0.50	0.68	0.58	0.70	0.60	0.61	14.8
	30.0	25.6	27.1	26.6	26.4	26.6	27.4	26.9	26.6	2.10
千里光宁碱	1.00	0.71	0.62	0.59	0.67	0.48	0.61	0.61	0.61	11.7
	30.0	23.1	24.5	23.5	23.6	22.1	22.8	23.7	23.3	3.40
	1.00	0.84	0.63	0.81	0.71	0.73	0.68	0.76	0.74	10.0

	30.0	24.2	23.1	25.1	21.8	23.1	23.7	25.0	23.7	4.90
毛果天芥菜碱	1.00	0.85	0.84	0.78	0.67	0.81	1.00	0.69	0.81	13.5
	30.0	25.5	25.7	25.7	28.5	25.6	26.5	27.1	26.4	4.20

2.4 加标回收率

在千里光和紫菀样品中，加入 100ppb 标准溶液和 1.0ppb 内标（野百合碱），然后按照样品前处理方法提取并分析。100ppb 加标对应干药材中的含量为 5 μ g/g，低于中国药典限值（40 μ g/g）。在所检测的化合物中，只有紫菀中的千里光菲灵碱的回收率在 50%-60%。其余化合物的回收率在 63%-111% 之间，能满足筛查分析的要求。

表 5 目标化合物在千里光和紫菀中的加标回收率

中药名	化合物名	平行测试 (%)							回收率 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	
野百合碱 N- 氧化物	千里光	93	89	97	80	89	92	92	80-97
	紫菀	76	97	87	81	93	96	95	81-97
阿多尼弗林碱	千里光	—	—	—	—	—	—	—	—
	紫菀	—	—	—	—	—	—	—	—
倒千里光碱	千里光	100	102	95	81	88	81	101	81-102
	紫菀	87	91	103	92	93	110	73	73-110
千里光菲灵碱	千里光	71	78	73	70	61	65	69	61-78
	紫菀	61	59	55	61	53	58	56	53-61
千里光宁碱	千里光	71	80	67	69	63	64	66	63-80
	紫菀	84	91	68	84	76	78	68	68-91
毛果天芥菜碱	千里光	65	76	78	72	70	77	59	59-78
	紫菀	65	72	68	75	69	69	71	65-75
千里光宁 N- 氧化物	千里光	111	88	82	91	96	87	82	82-111
	紫菀	96	90	82	107	93	90	94	82-107
千里光菲灵 N- 氧化物	千里光	77	73	69	79	78	86	81	69-86
	紫菀	80	78	77	83	87	87	91	77-91
克氏千里光	千里光	93	84	96	99	102	91	94	84-102
	紫菀	93	87	90	99	95	104	107	87-107

注：* 未测定。

2.5 实际样品测试和 LC-MS/MS 方法比对

用 DPiMS-8060 和 LC-MS/MS 同时测定了千里光和紫菀中吡咯里西啶类生物碱的含量，以 LC-MS/MS 为标准，评价 DPiMS-8060 的分析结果。比对结果按以下标准进行评价：

G- 良好，定性结果确认，DPiMS 与 LCMS 的比值小于 5；

M- 中等，定性结果确认，DPiMS 与 LCMS 的比值大于 5；

B- 不好，未确认存在。

结果，DPiMS-8060 的准确率为 78%（评价结果中等以上）。特别是阿多尼弗林碱 DPiMS-8060 与 LC-MS/MS 的测定结果相同。

表 6 天仙藤和细辛中马兜铃酸类物质的含量

化合物	药材	DPiMS ($\mu\text{g/g}$)			LC-MS/MS ($\mu\text{g/g}$)			mark
		1	2	ave.	1	2	ave.	
野百合碱 N-氧化物	千里光	0.59	0.52	0.62	N.D	N.D	N.D	B
	紫菀	0.52	0.55	0.60	N.D	N.D	N.D	B
阿多尼弗林碱	千里光	21.5	24.6	22.5	21.8	22.0	21.9	G
	紫菀	N.D	0.07	0.07	N.D	N.D	N.D	G
倒千里光碱	千里光	0.55	0.49	0.55	0.11	0.10	0.10	G
	紫菀	2.69	2.90	2.84	0.16	0.16	0.16	M
千里光菲灵碱	千里光	0.70	0.66	0.73	0.07	0.07	0.07	M
	紫菀	1.19	1.18	1.31	0.17	0.20	0.19	G
千里光宁碱	千里光	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	G
	紫菀	0.61	0.73	0.55	0.34	0.31	0.32	G
毛果天芥菜碱	千里光	0.62	0.39	0.48	0.03	0.03	0.03	M
	紫菀	0.31	0.47	0.44	N.D	0.02	0.02	M
千里光宁 N-氧化物	千里光	0.96	0.89	0.84	N.D	N.D	N.D	B
	紫菀	2.38	2.31	2.11	0.23	0.23	0.23	M
千里光菲灵 N-氧化物	千里光	1.22	1.40	1.19	N.D	N.D	N.D	B
	紫菀	1.43	1.53	1.54	0.52	0.56	0.54	G
克氏千里光	千里光	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	G
	紫菀	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	G

结论

基于探针电喷雾串联三重四极杆质谱 (DPiMS-8060), 建立了一种测定中草药中吡咯里西啶类生物碱的快速筛查和定量分析方法。结果表明, 该方法能满足日常分析的要求。该方法不使用色谱柱、流动相、雾化气和干燥气。具有分析时间短、精度高、灵敏度和选择性高等优点。因此, 适用于中草药和专利药中吡咯里西啶类生物碱的快速筛查和定量分析。