

· 基础研究 ·

灯盏细辛中吡咯里西啶生物碱的含量分析及其肝毒性风险评估[△]咎珂¹, 周颖², 李耀磊¹, 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, 浙江 杭州 310052

[摘要] 目的: 测定灯盏细辛中吡咯里西啶生物碱的含量, 根据测定结果对其肝毒性进行初步的风险评估。方法: 灯盏细辛样品经过固相萃取法提取后, 采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定印美定、石松胺、印美定-N-氧化物和石松胺-N-氧化物的含量。根据含量测定结果, 采用暴露限制(MOE)法对其肝毒性风险进行评估。结果: 8批灯盏细辛样品中印美定、石松胺、印美定-N-氧化物和石松胺-N-氧化物质量分数分别为15.14~66.72、11.32~42.55、26.32~98.34、19.82~55.23 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。MOE值为4787~12 130。结论: 灯盏细辛中吡咯里西啶生物碱的含量超过欧洲药品管理局的规定, 经初步风险评估显示部分批次存在一定的安全风险。

[关键词] 灯盏细辛; 肝毒性成分; 吡咯里西啶生物碱; 超高效液相色谱-串联质谱法; 含量测定; 风险评估

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)11-1897-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20210601004

Hepatotoxic Risk Assessment and Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Erigerontis Herba

ZAN Ke¹, ZHOU Ying², LI Yao-lei¹, 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. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China

[Abstract] **Objective:** To analyze the content of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in Erigerontis Herba, and to carry out preliminary risk assessment based on the content. **Methods:** Erigerontis Herba was extracted by solid phase extraction and then the content of intermedine, lycopsamine, intermedine-N-oxide, and lycopsamine-N-oxide was determined by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). According to the content, the hepatotoxicity was evaluated with the margin of exposure (MOE) approach. **Results:** The content of intermedine, lycopsamine, intermedine-N-oxide, lycopsamine-N-oxide in the 8 batches of Erigerontis Herba was 15.14-66.72, 11.32-42.55, 26.32-98.34, and 19.82-55.23 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. The MOE values ranged from 4787 to 12 130. **Conclusion:** The content of pyrrolizidine alkaloids in Erigerontis Herba exceeds the limit stipulated by the European Medicines Agency. The preliminary risk assessment shows that some batches have certain safety risks.

[Keywords] Erigerontis Herba; hepatotoxic component; pyrrolizidine alkaloid; UPLC-MS/MS; content determination; risk assessment

短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. 为菊科飞蓬属植物, 在我国分布于湖南、广西、贵州、四川、云南及西藏等省区, 其干燥全草作为灯盏细辛药材使用, 具有活血通络止痛、祛风

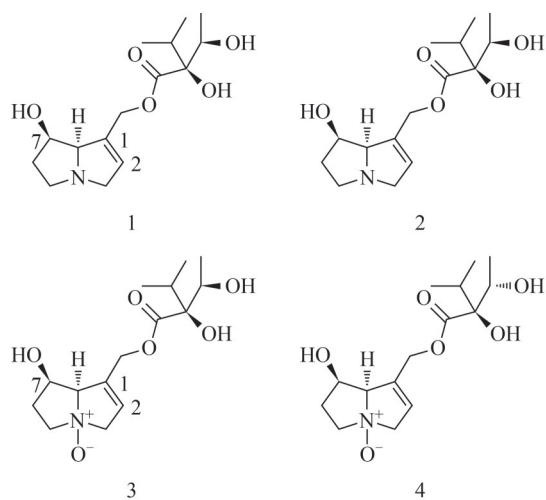
散寒的功效, 用于头痛、牙痛、风湿痹痛等疾病的治疗^[1-2]。灯盏生脉胶囊、灯盏花素片、灯盏细辛注射液等中成药使用灯盏细辛作为主要药材原料制成。灯盏细辛主要含有黄酮类、咖啡酰奎宁酸类、挥发

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

* [通信作者] 马双成, 博士, 研究员, 研究方向: 中药质量研究; E-mail: masc@nifdc.org.cn

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

油类等成分^[3-6]。近年来研究表明,灯盏细辛中含有痕量的吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs)^[7]。PAs在菊科植物中较为常见,其母核的1,2位如为不饱和双键则具有肝毒性,过量或长期摄入可导致肝损伤,甚至肝癌等严重疾病^[10]。灯盏细辛中PAs为痕量水平,一般需使用固相萃取法(solid phase extraction, SPE)富集净化后进行检测。印美定、石松胺、印美定-*N*-氧化物和石松胺-*N*-氧化物(图1)是灯盏细辛中4个主要的PAs,均具有肝毒性^[11]。超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)具有较高的灵敏度,常用于药材中PAs类成分的测定^[12-14]。本研究采用该方法建立灯盏细辛中4个PAs(印美定、石松胺、印美定-*N*-氧化物和石松胺-*N*-氧化物)的含量,并根据测定结果进行初步的风险评估。



注: 1. 印美定; 2. 石松胺; 3. 印美定-*N*-氧化物; 4. 石松胺-*N*-氧化物。

图1 灯盏细辛中4个吡咯里西啶生物碱成分结构

1 材料

Acquity H-CLASS型超高效液相色谱仪串联Xevo TQ-S型三重四极杆质谱(美国沃特世公司); S300H型超声波清洗器(德国ELMA公司); SECURA225-1CN型电子天平(德国Sartorius公司)。

对照品印美定(批号: 82424, 纯度: 99.07%)、石松胺(批号: 89726, 纯度: 99.11%)、印美定-*N*-氧化物(批号: 13418, 纯度: 100.00%)和石松胺-*N*-氧化物(批号: 83447, 纯度: 96.75%)均购于德国PhytoLab GmbH公司; 甲醇、乙腈、甲酸和甲酸铵均为MS级(美国费希尔公司); Milli-Q超纯

水(美国密理博公司)。

灯盏细辛8批药材, 分别于湖南省常德市, 贵州省黔南布依族苗族自治州、贵阳市, 广西壮族自治区玉林市、柳州市, 四川省成都市, 云南省大理白族自治州、丽江市等地采集(编号为S1~S8), 经中国食品药品检定研究院中药民族药检定所管珂副研究员鉴定为菊科植物短葶飞蓬*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. -Mazz. 的干燥全草, 见表1。

表1 灯盏细辛样品信息

编号	产地
S1	湖南常德
S2	贵州黔南
S3	贵州贵阳
S4	广西玉林
S5	广西柳州
S6	四川成都
S7	云南大理
S8	云南丽江

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液制备 精密称取印美定、石松胺、印美定-*N*-氧化物和石松胺-*N*-氧化物对照品适量, 分别加入10%乙腈水溶液制备成质量浓度分别为1.012、0.992、1.024、1.004 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品母液。精密量取混合对照品母液1.0 mL置于同一100 mL量瓶中, 加入10%乙腈水溶液至刻度, 即得质量浓度分别为10.12、9.92、10.24、10.04 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 取灯盏细辛粉末(过四号筛)约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, 超声处理(功率: 300 W, 频率: 40 kHz) 30 min, 取出, 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, 用定量滤纸滤过, 取续滤液进行SPE萃取。SPE柱先分别用甲醇5 mL和0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸水溶液5 mL洗脱, 取上述续滤液10 mL上样。待吸附后, 先用甲醇10 mL洗去杂质, 再用8%氨水-甲醇溶液10 mL洗脱, 收集该流分, 回收溶剂至1 mL左右, 用10%乙腈转移至10 mL量瓶中并定容至刻度, 用0.22 μm 有机滤膜滤过, 取

续滤液，即得。

2.2 色谱-质谱条件

色谱柱: WATERS Acquity UPLC HS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为水 (A) - 乙腈 (B), 水相和有机相中各按 1% 加入甲酸-甲酸铵缓冲液 (5% 甲酸和 0.25 mol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液); 梯度洗脱 (0 ~ 8 min, 3%~10%B; 8 ~ 20 min, 10%B); 流速: 0.30 mL·min⁻¹; 柱温: 40 °C; 进样量: 1 μL; 电喷雾离子源 (ESI⁺); 毛细管电压: 3.0 kV, 脱溶剂温度: 500 °C; 离子源温度: 150 °C; 质谱扫描采用多反应监测模式 (MRM); 其他质谱测定条件见表 2,

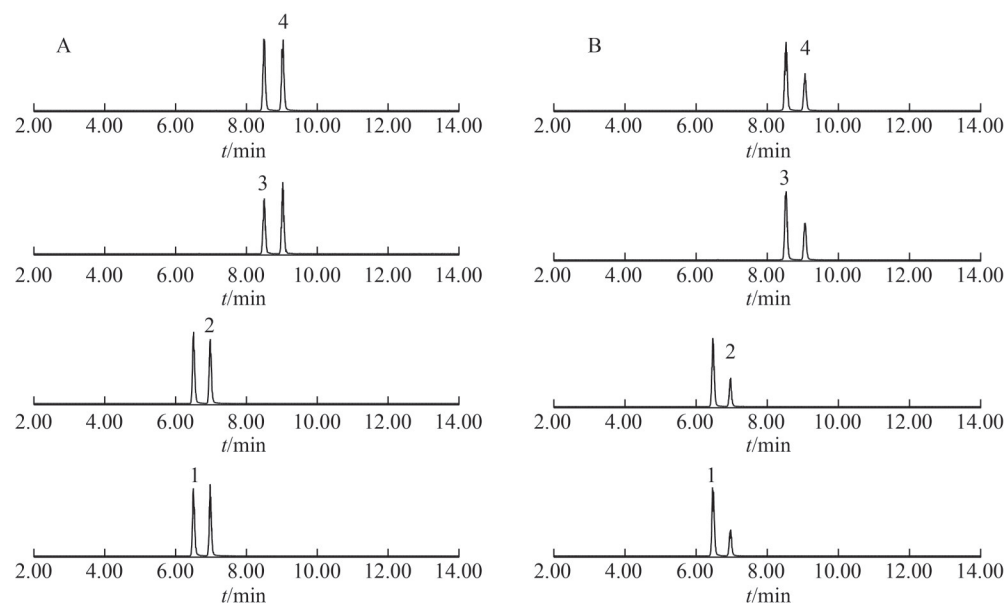
提取离子流图见图 2。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系及检测下限、定量下限考察 精密吸取 2.1.1 项下混合对照品母液用 10% 乙腈水溶液按 10、20、50、100、200、1000 倍进行稀释, 制得 6 个质量浓度的系列混合对照品溶液, 按照 2.2 项下色谱-质谱条件测定。以峰面积为纵坐标 (Y), 待测组分质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 绘制标准曲线, 得回归方程和相关系数 (r)。以信噪比 (S/N) 为 3 计算待测组分的检测下限, 以 S/N 为 10 计算待测组分的定量下限, 结果见表 3。

表 2 灯盏细辛中 4 个吡咯里西啶生物碱成分的质谱测定条件

化合物	t_R /min	母离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)		锥孔电压/V	碰撞能量/eV
			定量离子	定性离子		
印美定	6.50	300.2	94.1	138.1	26	30
石松胺	6.58	300.3	94.1	138.1	26	30
印美定-N-氧化物	8.49	316.2	94.1	172.1	30	44
石松胺-N-氧化物	9.04	316.3	172.1	94.1	30	44



注: A. 对照品; B. 灯盏细辛样品 (S1); 1. 印美定; 2. 石松胺; 3. 印美定-N-氧化物; 4. 石松胺-N-氧化物。

图 2 对照品溶液和灯盏细辛样品的 MRM 离子流色谱图

表 3 灯盏细辛中 4 个吡咯里西啶生物碱成分测定的回归方程、线性范围、检测下限和定量下限

化合物	回归方程	r	线性范围/ng·mL ⁻¹	定量下限/ng·mL ⁻¹
印美定	$Y=8910X-1482$	0.999 3	1.0 ~ 101.2	0.51
石松胺	$Y=8876X-1231$	0.999 1	1.0 ~ 99.2	0.50
印美定-N-氧化物	$Y=3502X-1674$	0.999 2	1.0 ~ 102.4	0.51
石松胺-N-氧化物	$Y=3683X-1075$	0.999 2	1.0 ~ 100.4	0.50

注: 检测下限均为 0.20 ng·mL⁻¹。

2.3.2 精密度试验 取2.1.1项下的混合对照品溶液,按2.2项下色谱-质谱条件测定,连续进样6次,记录峰面积并计算RSD。4个PAs峰面积的RSD分别为1.9%、2.1%、2.5%和2.6%。实验结果表明仪器具有良好的精密度。

2.3.3 稳定性试验 按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.2项下色谱-质谱条件测定,分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定,记录峰面积并计算RSD。4个PAs峰面积的RSD分别为1.8%、2.1%、2.3%和2.2%。实验结果表明,供试品溶液稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 精密称取同一批次(S1)药材样品6份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.2项下色谱-质谱条件测定,计算化合物的质量分数。4个PAs的平均质量分数分别为20.42、9.82、41.08、19.90 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, RSD分别为2.8%、2.9%、3.5%和3.7%。结果表明,实验方法具有良好的重复性。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取2.3.4项下已测得含量的灯盏细辛粉末6份,每份各约1.0 g,分别近似1:1加入各对照品,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.2项下色谱-质谱条件测定含量,计算回收率,4个PAs的平均加样回收率分别为94.2%、90.6%、88.7%和92.8%, RSD分别为4.0%、3.7%、4.2%和3.9%。

2.4 样品含量测定

分别精密称取不同产地的灯盏细辛样品粉末,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.2项下色谱-质谱条件测定峰面积,采用外标法计算得到4个PAs的含量结果,见表4。

3 风险评估

灯盏细辛所测8批样品中4个PAs的总质量分数为91.18~231.03 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。《中华人民共和国药典》2020年版一部灯盏细辛项下规定用量为9~15 g^[1],按此计算,每日摄入PAs范围为0.82~3.46 μg 。目前国内尚无对该药材中PAs限值的規定。欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)在2016年规定每日摄入PAs量应不超过0.35 μg ^[7,15],8批灯盏细辛中PAs的含量均超过EMA每日摄入量的规定。

目前世界各国权威机构对肝毒性PAs的风险评

表4 各批次灯盏细辛样品中4个吡咯里西啶生物碱成分的质量分数(n=2)

编号	质量分数				$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 总质量 分数
	印美定	石松胺	印美定-N-氧化物	石松胺-N-氧化物	
S1	20.45	9.86	41.05	19.82	91.18
S2	16.75	11.32	82.52	43.23	153.82
S3	32.42	18.44	55.21	25.74	131.81
S4	26.32	22.42	76.88	55.23	180.85
S5	66.72	42.55	98.34	23.42	231.03
S6	28.21	32.23	86.22	54.23	200.89
S7	43.12	15.12	26.32	22.53	107.09
S8	15.14	22.31	63.34	34.34	135.13

估均采用暴露限制(margin of exposure, MOE)计算得出。若MOE>10 000,健康风险较低;反之,风险应予以关注。根据文献报道,采用公式(1)~(2)计算灯盏细辛中PAs的MOE^[7],结果见表5。

$$\text{EDI} = C \times M / (\text{BW} \times 1000) \quad (1)$$

$$\text{MOE} = \text{BMDL}_{10} / \text{EDI} \quad (2)$$

式中,EDI(estimated daily intake)为估计每日摄入量($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$);C为药材中含有的PAs总质量分数($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$);M为《中华人民共和国药典》2020年版规定的药材最大使用剂量,灯盏细辛为15 g;BW为人体体质量,按70 kg计算;1000为换算因子。BMDL₁₀是PAs的健康指导值,为237 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ^[13]。

表5 灯盏细辛中4个吡咯里西啶生物碱成分风险评估结果

编号	EDI/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	MOE
S1	0.019 5	12 130
S2	0.033 0	7190
S3	0.028 2	8391
S4	0.038 8	6116
S5	0.049 5	4787
S6	0.043 0	5506
S7	0.022 9	10 328
S8	0.029 0	8185

8批药材的MOE为4787~12 130;其中有6批的MOE<10 000,如长期使用,存在一定的安全风险。按MOE最低值计算,如灯盏细辛每日摄入量低于7.2 g,则MOE>10 000,健康风险较低。

4 讨论

本研究建立了UPLC-MS/MS对灯盏细辛中4个

主要PAs含量进行同步测定,经方法学考察符合要求。含量分析结果显示,印美定、石松胺、印美定-*N*-氧化物和石松胺-*N*-氧化物在8批次灯盏细辛中的质量分数分别为15.14~66.72、11.32~42.55、26.32~98.34、19.82~55.23 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。风险评估显示,灯盏细辛存在一定的用药安全风险,应尽量减少用药量或缩短用药周期。本研究测定的灯盏细辛样品数量有限,不同批次样品间PAs含量存在一定差异,应进一步扩大采样量及范围,研究不同产地、不同采收月份灯盏细辛样品中PAs含量的规律,为灯盏细辛药材的选用提供参考。

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,2020:154.
- [2] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志:第74卷[M]. 北京:科学出版社,1985:308-309.
- [3] 夏靓. 灯盏细辛的化学成分及其制剂的研究进展[J]. 中国药房,2016,27(1):111-113.
- [4] 郭欣,林珊,吴丽明,等. 灯盏细辛化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药,2019,41(2):393-402.
- [5] 普元柱,苏灿. 灯盏细辛及其活性成分防治阿尔茨海默病的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2020,45(23):5650-5657.
- [6] HAN S, LIU Y, HOU Z L, et al. Sesquiterpenoids and γ -pyranone derivatives from the whole plant of *Erigeron breviscapus* and their neuroprotective effects [J]. Fitoterapia, 2019, 138: 104288.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 孙满翔,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.
- [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, ČÁSLAVSKÝ J, POSPÍCHALOVÁ M, et al. UPLC-MS/MS method for determination of selected pyrrolizidine alkaloids in feed [J]. Food Chem, 2015, 170: 265-270.
- [13] 管珂,周颖,李耀磊,等. 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[J]. 中国药事,2021,35(7):757-762.
- [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] European Medicines Agency. Public statement on contamination of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products with pyrrolizidine alkaloids [R/OL]. (2016-05-31) [2021-06-01]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_gb/document_library/public_statement/2016/06/wc500208195.pdf.

(收稿日期: 2021-06-01 编辑: 田苗)