

《中药中吡咯里西啶类生物碱检测 液相色谱-串联质谱法》

编制说明

一、标准工作简况

吡咯里西啶类生物碱是一类具有多种生物活性的化合物，它们广泛存在于植物中，有些具有毒性，国内因服用含有HPAs的中药，如菊三七（又名土三七）、千里光等引起肝窦阻塞综合征（HSOS）的病例每年都有报道，因此对其进行有效的检测是非常重要的。目前，国内没有制定的专门测试中药中多种吡咯里西啶类生物碱的技术标准。

二、标准编制原则和标准主要技术内容

1、编制原则

本标准按照GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

本标准规定了超高效液相色谱-串联质谱法测定中药中27种吡咯里西啶类生物碱含量的的术语和定义、试剂和材料、仪器与设备、测定步骤和结果分析。

本标准采用超高效液相色谱-串联质谱法（HPLC-MS/MS）方法对中药分析。适用于中药中吡咯里西啶类生物碱的种类判定和含量的测定。本标准的编写制定过程以提高测试方法选择性、精密度、灵敏度、准确度和分析效率，降低分析成本为总原则，力求反映科学技术的先进成果和先进经验。遵循了标准制定过程中的先进性、经济性和适用性原则。

2、标准研制目的

建立中药中27种吡咯里西啶类生物碱的种类判定和含量的测定。27种吡咯里西啶类生物碱见表1

表1 27种吡咯里西啶类生物碱信息

英文通用名	中文别名	CAS登记号	分子式	分子量
Echimidine	蓝蓟定	520-68-3	C20H31N07	397.46
Echimidine N-oxide	蓝蓟定氧化物	41093-89-4	C20H31N08	413.46
Erucifoline N-oxide	芝麻菜叶千里光碱氧化物	123864-94-8	C18H23N07	365.38
Europine	欧天芥菜碱	570-19-4	C16H27N06	329.39
Europine N-oxide	欧天芥菜碱氧化物	65582-53-8	C16H27N07	345.39

Heliotrine	天芥菜碱	303-33-3	C16H27N05	313.39
Heliotrine N-oxide	欧天芥菜碱氧化物	6209-65-0	C16H27N06	329.39
Intermedine	印美定	10285-06-0	C15H25N05	299.36
Intermedine-N-oxide	印美定氧化物	95462-14-9	C15H25N06	315.36
Jacobine	千里光碱	6870-67-3	C18H25N06	351.39
Jacobine N-oxide	千里光碱氧化物	38710-25-7	C18H25N07	367.39
Lasiocarpine	毛果天芥菜碱	303-34-4	C21H33N07	411.49
Lasiocarpine N-oxide	毛果天芥菜碱氧化物	127-30-0	C21H33N08	427.49
Lycopsamine	石松胺	10285-07-1	C15H25N05	299.36
Lycopsamine-N-oxide	石松胺氧化物	95462-15-0	C15H25N06	315.36
Monocrotaline	野百合碱	315-22-0	C16H23N06	325.36
Monocrotaline-N-oxide	野百合碱氧化物	35337-98-5	C16H23N07	341.36
Retrorsine	倒千里光碱	480-54-6	C15H25N06	351.40
Retrorsine-N-oxide	倒千里光碱氧化物	15503-86-3	C18H25N07	367.39
Senecionine	千里光宁	130-01-8	C18H25N05	335.39
Senecionine N-oxide	千里光宁氧化物	13268-67-2	C18H25N06	351.39
Seneciophylline	千里光菲灵碱	480-81-9	C18H23N05	333.39
Seneciophylline N-oxide	千里光菲灵碱氧化物	38710-26-8	C18H23N06	349.39
Senecivernine	春光千里碱	72755-25-0	C18H25N05	335.39
Senecivernine N-oxide	春千里光碱氧化物	101687-28-9	C18H25N06	351.39
Senkirkine	克氏千里光碱	2318-18-5	C19H27N06	365.43
Trichodesmine	毛束草碱	548-90-3	C18H27N06	353.41

3、技术要求

供试品通过使用酸水超声波提取和固相萃取净化、富集，以三重四极杆串联质谱仪检测；离子源为电喷雾（ESI）离子源，正离子扫描模式，利用多反应监测（MRM）模式，用外标法定量，计算供试品中吡咯里西啶类生物碱的质量分数。

（1）定性确认

供试品色谱中如果检出色谱峰的保留时间与对照品一致，并且在扣除背景后的质谱图中，所选择的2个监测离子对均出现，而且所选择的监测离子对峰面积比与对照品的监测离子对峰面积比一致（相对比例 $>50\%$ ，允许 $\pm 20\%$ 偏差；相对比例 $>20\% \sim 50\%$ ，允许 $\pm 25\%$ 偏差；相对比例 $>10\% \sim 20\%$ ，允许 $\pm 30\%$ 偏差；相对比例 $<10\%$ ，允许 $\pm 50\%$ 偏差），则可判断供试品中检出该化合物。

（2）质量分数测定

供试品中吡咯里西啶类生物碱的含量按式（1）计算：

$$Xi = \frac{Ci \times f}{m \times 1000} \dots \dots \dots \quad (1)$$

式中：

X_i ——供试品中被测组分的含量, 单位为 mg/kg;

C_i -----从标准曲线上得到的待测溶液中吡咯里西啶类生物碱的浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

f-----稀释倍数;

m——供试品的质量, 单位为克 (g)

4、试验方法

(1) 试验溶液的配制

对照品贮备溶液的配制 精密量取混合对照品溶液,用甲醇制备制成浓度为1000ng/mL的混合对照品溶液。

混合对照品溶液的制备 精密量取各对照品贮备溶液适量, 用甲醇制成浓度为 5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL 的系列混合对照品溶液。

供试品溶液的制备 取供试品粉末（过三号筛），取约 3.0g，精密称定，置于 100mL 具塞离心管中，加入 0.05mol/L 硫酸溶液 50mL，称重，超声处理 30 分钟，放至室温，再称定重量，用 0.05mol/L 硫酸溶液补足减失的重量，离心 5 分钟（每分钟 4000 转），精密吸取上清液 10mL 进行固相萃取柱萃取。固相萃取柱先分别用 5mL 甲醇和 5mL 0.05mol/L 硫酸溶液活化，上样后，分别用 10mL 甲醇和 10mL 8% 氨水 - 甲醇溶液洗脱，收集氨水 - 甲醇溶液洗脱液，减压浓缩至约 1mL，用 50% 甲醇稀释至 5mL，用 0.22 μ m 滤膜过滤，即得。

方法准确度溶液的配制 取供试品粉末（过三号筛），取约3.0g（9份），分别精密加入0.2mL、0.5mL、1mL浓度为1000ng/mL的混合对照品溶液，每个浓度3份，按“供试品溶液的制备”的方法，即得。

(2) 高效液相色谱-串联质谱法测定

液相色谱条件 色谱柱: 用十八烷基硅烷键合核壳硅胶为填充剂(Agilent Poroshell 120 EC-C18, 柱长为 150mm, 内径为 3mm, 粒径为 $2.7 \mu m$ 或等柱效);流动相: 以 0.05% 甲酸溶液(含 10mmol/L 甲酸铵)为流动相 A, 以 0.05% 甲酸的甲醇溶液(含 10mmol/L 甲酸铵)为流动相 B, 梯度洗脱程序见表 2; 流速: 0.6mL/min;

柱温: 35℃; 进样量: 1μL。

表 2 梯度洗脱程序

时间(分钟)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~5	92→90	8→10
5~5.1	90→82	10→18
5.1~18	82→79	18→21
18~21	79→40	21→60
21~24	40	60

串联质谱参考条件 以三重四极杆串联质谱仪检测; 离子源为电喷雾(ESI)离子源, 正离子扫描模式。监测模式为多反应监测(MRM), 各化合物参考保留时间、监测离子对、碰撞电压(CE)见表 2。为提高检测灵敏度, 可根据保留时间分段监测各化合物。

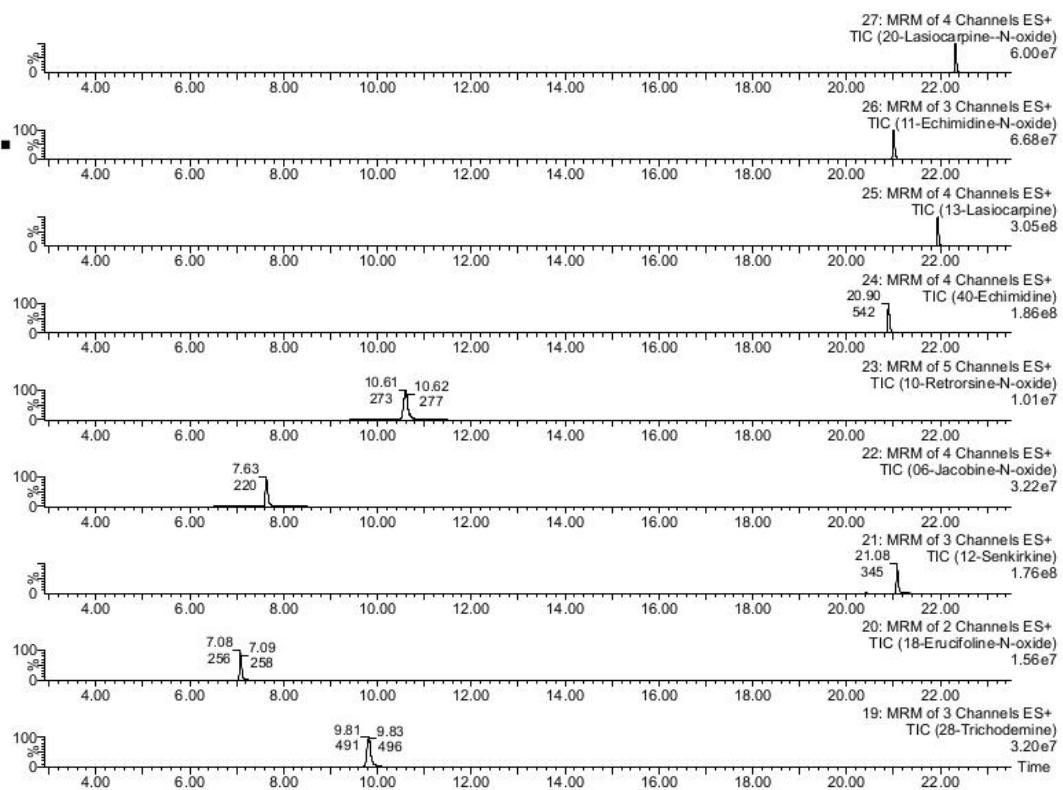
测定法 分别精密量取上述各浓度溶液, 分别注入液相色谱-串联质谱仪, 按外标标准曲线法计算供试品中 27 种吡咯里西啶类生物碱的含量。

表 3 各化合物保留时间、监测离子对及碰撞电压(CE)参考值

编 号	中文名	英文名	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE (V)
1	蓝蓟定	Echimidine	20.9	398.1	220.2 238.1	15 25
2	蓝蓟定 N-氧化物	Echimidine N-oxide	21.1	414.0	254.0 352.1	25 24
3	芝麻菜叶千里光碱-N氧化物	Erucifoline N-oxide	7.1	366.0	119.2 136.1	30 30
4	欧天芥菜碱	Europine	7.2	330.2	138.0 156.0	40 40
5	欧天芥菜碱 N-氧化物	Europine N-oxide	7.8	346.3	111.1 172.1 108.2	40 25 35
6	天芥菜碱	Heliotrine	11.2	314.3	120.2 138.2 156.1	30 20 25
7	天芥菜碱 N-氧化物	Heliotrine N-oxide	13.0	330.1	153.1 181.1 207.1	45 30 30

8	印美定	Intermedine	7.1	300.1	120.2	25
					138.1	20
					156.1	30
9	印美定 N-氧化物	Intermedine-N-oxide	8.3	316.2	138.2	25
					172.1	25
					162.2	25
					105.2	30
10	千里光碱	Jacobine	7.0	352.1	120.2	30
					155.1	30
					162.2	25
11	千里光碱 N-氧化物	Jacobine N-oxide	7.6	367.9	190.1	18
					249.0	35
12	毛果天芥菜碱	Lasiocarpine	21.9	412.0	120.1	45
					220.1	22
					238.1	22
13	毛果天芥菜碱 N-氧化物	Lasiocarpine N-oxide	22.3	410.0	106.2	30
					120.2	30
					136.1	30
14	石松胺	Lycopsamine	7.3	300.0	138.1	20
					156.1	28
15	石松胺 N-氧化物	Lycopsamine-N-oxide	8.7	316.2	138.2	23
					172.1	25
					121.2	20
16	野百合碱	Monocrotaline	3.8	326.1	164.1	20
					194.1	20
17	野百合碱 N-氧化物	Monocrotaline-N-oxide	6.5	342.1	119.2	25
					137.1	25
					236.1	25
18	倒千里光碱	Retrorsine	9.7	324.1	120.1	20
					138.1	20
19	倒千里光碱 N-氧化物	Retrorsine-N-oxide	10.6	368.1	136.3	40
					248.9	25
					156.0	30
					108.2	35
20	千里光宁	Senecionine	15.4	336.2	120.1	25
					138.1	30
					156.0	30
21	千里光宁 N-氧化物	Senecionine N-oxide	17.6	352.1	118.1	25
					136.1	35
					220.1	25
22	千里光菲灵碱	Seneciophylline	10.9	334.1	105.2	50
					120.2	26
					138.2	28

23	千里光菲灵 碱 N-氧化物	Seneciophylline N-oxide	12.4	350.1	106.1 120.1 136.1 154.1 108.1	30 25 30 25 25
24	春光千里碱	Senecivernine	14.4	336.1	120.2 138.1 156.0	25 30 40
25	春千里光碱 N-氧化物	Senecivernine N-oxide	16.2	352.4	91.0 252.1	40 15
26	克氏千里光 碱	Senkirkine	20.1	366.0	122.2 150.1 168.1	30 25 25
27	毛束草碱	Trichodesmine	7.8	354.0	120.2 208.1 222.1	35 25 26



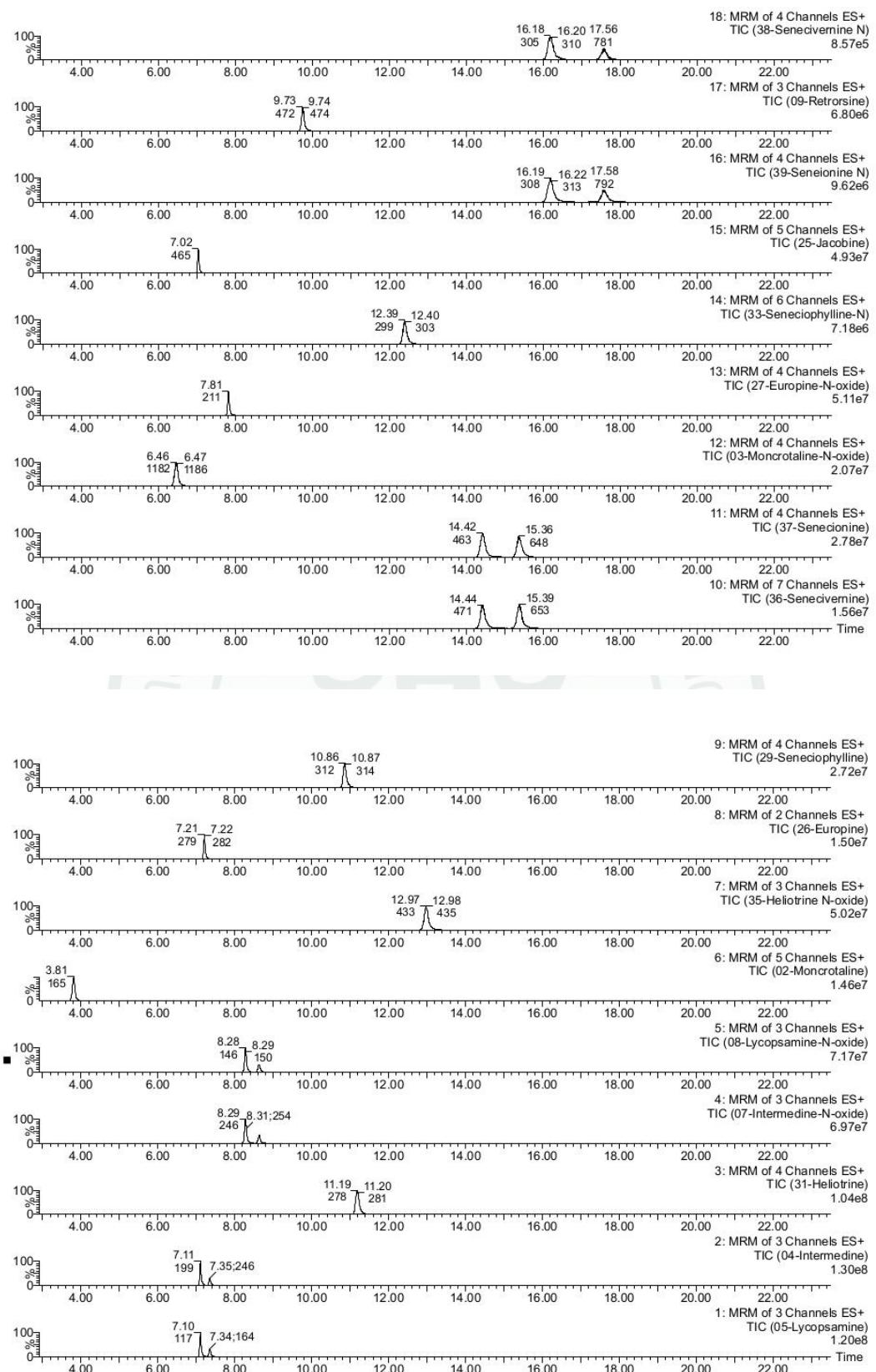


图 1 27 种吡咯里西啶类生物碱的总离子流图

5、试剂与材料

(1) 试剂：甲醇 (CH3OH)；甲酸 (HCOOH)；甲酸铵 (HCOONH4)；硫酸：分析纯；氨水：分析纯；0.05mol/L 硫酸溶液：取硫酸 3mL，缓缓注入适量水中，冷却至室温，加水稀释至 1000mL，摇匀。8%氨水 - 甲醇溶液：取氨水 160mL，缓缓注入适量甲醇中，冷却至室温，加甲醇稀释至 1000mL，摇匀。50%甲醇：取甲醇 50mL，缓缓注入适量水中，冷却至室温，加水稀释至 100mL，摇匀。0.05%甲酸溶液(含 10mmol/L 甲酸铵)：取 0.5mL 甲酸，0.63g 甲酸铵，缓缓注入适量水中，加水稀释至 1000mL，摇匀。0.05%甲酸的甲醇溶液(含 10mmol/L 甲酸铵)：取 0.5mL 甲酸，0.63g 甲酸铵，缓缓注入适量甲醇中，加甲醇稀释至 1000mL，摇匀。微孔过滤膜（有机相）：0.22μm。PCX 固相萃取小柱 (200 mg/6 mL)。

(2) 仪器：液相色谱-串联质谱仪：三重四极杆串联质谱；配备离子源为电喷雾 (ESI) 离子源。色谱柱：十八烷基硅烷键合核壳硅胶为填充剂 (Agilent Poroshell 120 EC-C18，柱长为 150mm，内径为 3mm，粒径为 2.7 μm)。超声波清洗器；离心机；分析天平：感量 0.1mg；量瓶：5 mL；微量移液器：100-1000μL 量程、20-200μL 量程。

(3) 标准物质：27 种吡咯里西啶类生物碱混合对照：DIKMA，100μg/mL。

三、主要试验的验证结果

(1) 仪器精密度

取浓度为 20ng/mL 混合对照品溶液，按分析条件连续进样 6 次，计算各分析物的 RSD 值，结果各分析物的 RSD 在 1.48%~5.99% 之间，表明仪器精密度良好。

(2) 线性关系考察

取系列混合对照品溶液，以各分析物的质量浓度为横坐标 (X)，各分析物定量离子对峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线。以分析物定性离子对的 3 倍信噪比为检出限 (LOD)，以分析物定量离子对的 10 倍信噪比为定量限 (LOQ)。见表 2，各分析物在线性范围内线性关系良好。

表 4 27 种吡咯里西啶类生物碱的线性关系考察结果

编号	英文名称	线性范围/ μg •L ⁻¹	线性方程	r	LOD ng/mL	LOQ ng/mL
1	Lycopsamine	5-100	Y=8925.44 *X + 1359.62	0.999 9	0.2	0.5

2	Intermedine	5-100	Y=30358.1 * X+ -8904.99	1.000 0	0.2	0.5
3	Heliotrine	5-100	Y=88646.3 * X + 44484.1	0.999 1	0.2	0.5
4	Intermedine N-oxide	5-100	Y=27778.4 * X + -22227.3	1.000 0	0.2	0.5
5	Lycopsamine N-oxide	5-100	Y=9676.53 * X + -5282	0.999 9	0.2	0.5
6	Moncrotaline	5-100	Y=4071.07 * X + -4137.35	0.999 9	0.2	0.5
7	Heliotrine N-oxide	5-100	Y=43427.3 * X + -31973	1.000 0	0.2	0.5
8	Europine	5-100	Y=3359.56 * X + 2972.03	0.999 7	0.2	0.5
9	Seneciophylline	5-100	Y=12772.3 * X+ -4308.39	0.999 5	0.2	0.5
10	Senecivernine	5-100	Y=8731.13 * X+ -8069.62	0.999 9	0.2	0.5
11	Senecionine	5-100	Y=22458.1 * X+ -17521	0.999 9	0.3	1
12	Moncrotaline N-oxide	5-100	Y=9280.24 *X+ -7781.51	0.999 9	0.2	0.5
13	Europine N-oxide	5-100	Y=16228.6 * X + 5853.58	0.999 9	0.2	0.5
14	Seneciophylline N-oxide	5-100	Y=2672.79 * X+ -491.336	0.999 9	0.2	0.5
15	Jacobine	5-100	Y=8533.62 * X + 1571.64	0.999 5	0.2	0.5
16	Seneionine N-oxide	5-100	Y=2016.97 * X + 703.21	0.999 5	0.2	0.5
17	Retrorsine	5-100	Y=2267.38 * X + -1934.18	0.999 6	0.2	0.5
18	Senecivernine N-oxide	5-100	Y=1094.69 * X+ -697.939	0.999 9	0.2	0.5
19	Trichodemine	5-100	Y=16086.4 * X + -24053.1	0.999 8	0.2	0.5
20	Erucifoline N-oxide	5-100	Y=3598.93 * X+ -246.698	0.999 9	0.2	0.5
21	Senkirkine	5-100	Y=32745.8 * X + -902.394	0.999 9	0.1	0.3
22	Jacobine N-oxide	5-100	Y=9094.39 * X + -9718.95	0.999 9	0.2	0.5
23	Retrorsine N-oxide	5-100	Y=3998.06 * X+ 764.235	0.999 8	0.2	0.5

24	Echimidine	5-100	Y=52005.3 * X + 12281.2	0.999 6	0.2	0.5
25	Lasiocarpine	5-100	Y=51243.5 *X+ 44462.7	0.999 7	0.2	0.5
26	Echimidine N-oxide	5-100	Y=15299.9 * X + 4459.59	0.999 9	0.2	0.5
27	Lasiocarpine N-oxide	5-100	Y=11481 * X + 1910.75	0.999 9	0.2	0.5

(3) 重复性试验与精密性试验

取方法准确度溶液,按分析条件,外标标准曲线法定量法计算回收率和测定值的相对标准偏差(RSD)。结果显示,回收率60.7%~106.8%,且RSD<15%,准确度良好。

(4) 稳定性试验

取浓度为 20ng/mL 混合对照品溶液，在测试的温湿度条件下，不同时间间隔考察 24 h 内的稳定性，记录各分析物定量离子对峰面积变化并计算 RSD，结果各分析物峰面积的 RSD 均不超过 10%，表明各分析物在 24 h 内稳定较好。

(5) 耐用性考察

流动相的选择：考察了甲醇-甲酸溶液、乙腈-乙酸溶液、不同浓度甲酸铵水溶液流动相的对照品的灵敏度，发现加入甲酸铵可提高检测千里光宁的灵敏度。

流动相梯度的优化选择：优化流动相梯度，使印美定，石松胺及其氧化物；千里光宁和春千里光碱及其氯化物等同分异构体能够有效分离。

净化方式的选择：比较 MCX 固相萃取小柱、PCX 固相萃取小柱和 HLB 固相萃取小柱的加标回收率，发现 PCX 固相萃取小柱整体回收率优于其余两种。

(6) 样品的测定

采用所建立的方法分析了 10 批次样品, 共检出 14 种 PAs, 不同批次检出的 PAs 种类及含量均有差异, 其中检出率最高的为野百合碱、千里光菲灵碱、全缘千里光碱、千里光宁、千里光菲灵碱 N-氧化物、千里光碱、克氏千里光碱、千里光碱 N-氧化物, 吡咯里西啶类生物碱总检出量为 0.24~2.05mg/kg。

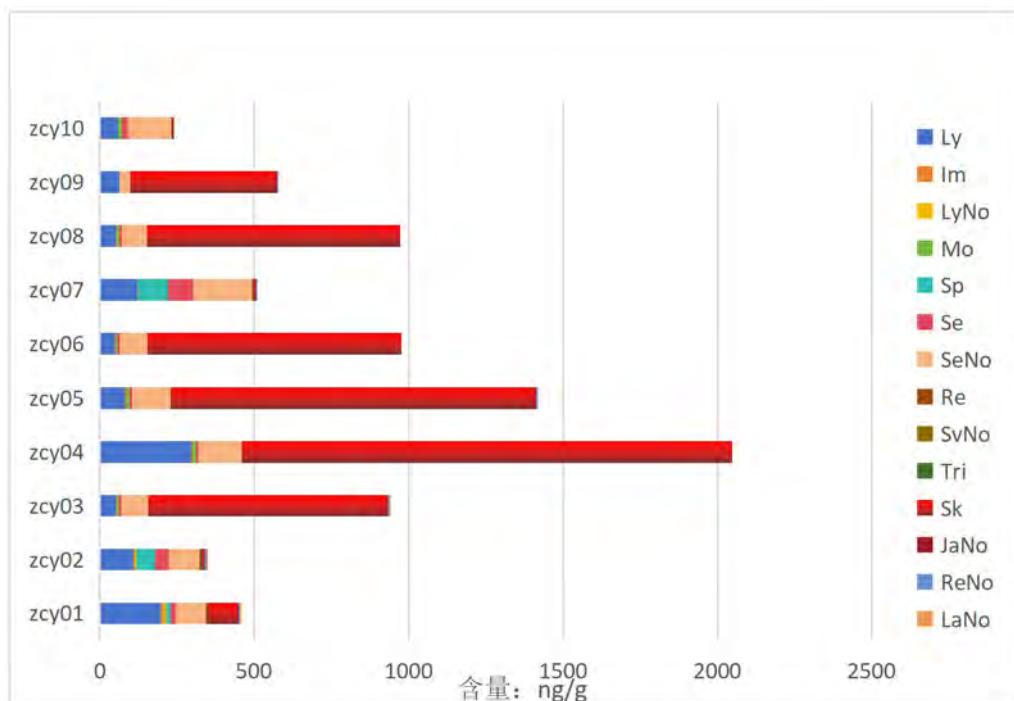


图 2-10 批次样品中 PAs 的测定结果

四、采用国际标准和国外先进标准的程度及水平的对比情况

本标准是国内首次制定的专门测试中药中多种吡咯里西啶类生物碱的技术标准，在分析物的选择上，借鉴了欧美监管使用的吡咯里西啶类生物碱及我国市场上有售的生物碱混合对照品。根据中药基质的特点，采用目前主流的酸水提取、PCX 固相萃取净化、氮吹浓缩的前处理方式，液相色谱-串联质谱法测试。

五、与有关的现行法律、法规和国家标准的关系

本标准与相关法律、法规和国家标准体系中的其他标准在技术内容上协调一致。

六、作为团体标准的建议

本标准可用于指导中药中多种吡咯里西啶类生物碱分析测试，在条件成熟的情况下，建议尽快申请转化为推荐性国家标准。