



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113155944 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 21

(21) 申请号 202010013660.9

(22) 申请日 2020.01.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113155944 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(73) 专利权人 岛津企业管理(中国)有限公司
地址 200120 上海市浦东新区上海自由贸易
易试验区富特西一路381号汤臣园区
A1楼第6层B部位

(72) 发明人 陈振贺 李晓东 滨田尚树

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277
专利代理师 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

G01N 27/68 (2006.01)

(56) 对比文件

JP 2011027429 A, 2011.02.10

KR 20190087900 A, 2019.07.25

CN 110187016 A, 2019.08.30

CN 110208358 A, 2019.09.06

CN 106404945 A, 2017.02.15

CN 105259273 A, 2016.01.20

KR 20170142673 A, 2017.12.28

李玫. 电喷雾质谱在医药领域应用进展. 现
代仪器与医疗. 2013, (03), 15-20.

审查员 吴珊珊

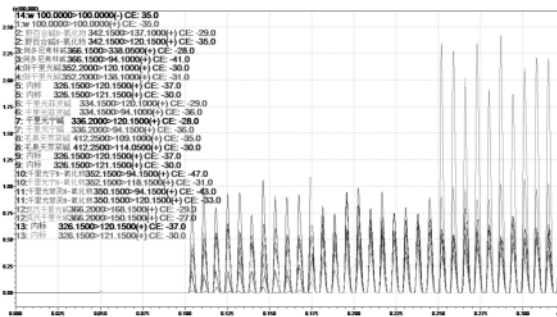
权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54) 发明名称

吡咯里西啶类生物碱的分析方法

(57) 摘要

本发明涉及吡咯里西啶类生物碱的分析方法, 其是针对作为分析对象的样品, 使用探针电喷雾电离子质谱法, 分析吡咯里西啶类生物碱的方法, 所述方法具备以下步骤: 稀释步骤, 在所述样品中添加缓冲液进行稀释; 以及, 质谱分析步骤, 将稀释后的所述样品进行探针电喷雾电离, 并导入到质谱分析装置, 所述缓冲液含有选自酸解离常数pKa为4.8以下的羧酸和该羧酸的铵盐组成的组中的任一种或两种以上。



1. 一种吡咯里西啶类生物碱的分析方法,其特征在于,其是针对作为分析对象的样品,使用探针电喷雾电离质谱法,分析吡咯里西啶类生物碱的方法,

所述方法具备以下步骤:

稀释步骤,在所述样品中添加缓冲液进行稀释;以及,

质谱分析步骤,将稀释后的所述样品进行探针电喷雾电离,并导入到质谱分析装置,

所述缓冲液含有选自酸解离常数 pK_a 为4.8以下的羧酸和该羧酸的铵盐组成的组中的任一种或两种以上,

所述缓冲液含有水和有机溶剂,所述有机溶剂为选自由二甲亚砜、甲酰胺和碳数为2~4的醇组成的组中的任一种或两种以上。

2. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于,所述选自酸解离常数 pK_a 为4.8以下的羧酸和该羧酸的铵盐组成的组中的任一种或两种以上在所述缓冲液中的总含量为0.05~0.2重量%。

3. 根据权利要求1或2所述的分析方法,其特征在于,所述样品为选自由蔬菜、饲料、谷物、茶、中药材、中药提取物、以及中药制剂组成的组中的任一种或两种以上。

4. 根据权利要求3所述的分析方法,其特征在于,所述样品包含选自由千里光、款冬花、佩兰、野马追、紫草、滇紫草、泽兰、鹤虱、紫菀、一点红、红凤菜、琉璃苣、菊三七、白背三七、聚合草组成的组中的任一种或两种以上。

5. 根据权利要求1或2所述的分析方法,其特征在于,所述样品为选自由蜂蜜、蜂花粉、蜂王浆、奶及奶制品组成的组中的任一种或两种以上。

6. 根据权利要求1或2所述的分析方法,其特征在于,所述样品为固体样品,在所述稀释步骤之前,还包括以下步骤:

粉碎步骤,将所述固体样品粉碎;以及,

提取步骤,在粉碎后的所述固体样品中加入提取溶剂进行提取,得到样品提取液,

将所述样品提取液供于所述稀释步骤。

7. 根据权利要求6所述的分析方法,其特征在于,所述提取溶剂含有酸解离常数 pK_a 为4.8以下的羧酸。

8. 根据权利要求1或2所述的分析方法,其特征在于,所述有机溶剂与水的体积比为70/30~20/80。

9. 根据权利要求1或2所述的分析方法,其特征在于,所述有机溶剂为异丙醇和/或乙醇。

10. 根据权利要求1或2所述的分析方法,其特征在于,所述 pK_a 为4.8以下的羧酸为甲酸。

11. 根据权利要求1或2所述的分析方法,其特征在于,所述吡咯里西啶类生物碱为选自由野百合碱N-氧化物、阿多尼弗林碱、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N-氧化物、千里光菲灵N-氧化物、克氏千里光碱组成的组中的任一种或两种以上。

12. 根据权利要求1或2所述的分析方法,其特征在于,所述质谱分析装置为三重四极杆质谱仪。

13. 根据权利要求1或2所述的分析方法,其特征在于,所述质谱分析步骤中,在多反应

监测模式下分析吡咯里西啶类生物碱。

吡咯里西啶类生物碱的分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分析化学、质谱分析、中草药分析等领域,尤其涉及一种吡咯里西啶类生物碱的分析方法。

背景技术

[0002] 吡咯里西啶类生物碱(PAs),又称双稠吡咯啶生物碱,是一类分布广泛的植物毒素。PAs已在13个科的植物中检出,多数属于紫草科(聚合草属和天芥菜属)、菊科(千里光属、狗舌草属、橐吾属及泽兰属)和豆科(野百合属)。PAs大部分具有肝毒性,一些PAs还有致癌、致突变和致畸胎的毒性。

[0003] 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。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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (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 $\mu\text{g}/\text{g}$)。PAs广泛存在于中草药、茶叶、谷物中,可以通过食物链传递进入人体,危害人的健康。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。

[0004] 对于吡咯里西啶类生物碱的定性定量,传统的方法一般是先提取,然后纯化或者稀释后,经色谱分离后再进行检测。例如,传统的吡咯里西啶类生物碱的分析方法,有的采用固相萃取法对样品进行纯化,需要经过活化、上样、淋洗和洗脱四个步骤,步骤繁复。此外,还公开了基于多相萃取系统对中药制剂中吡咯里西啶生物碱进行纯化的方法(参照专利文献1)。然后,在进行液相色谱分离时,分析时间长(一个化合物分析时间通常 >20 分钟(min)),消耗大量有机溶剂,造成环境污染。最后用紫外、荧光或者质谱进行检测。如果采用APCI或者ESI电离源进行检测时,还需要消耗大量脱溶剂气和雾化气。

[0005] 近年来,作为检测吡咯里西啶类生物碱的方法,例如报道了,通过GC-MS、LC-(ESI)-MS/MS进行植物提取物中吡咯烷核生物碱的鉴定和定量(非专利文献1);通过UPLC-UV和HPLC-TOF-MS分析PAs(非专利文献2);以及通过液相色谱-质谱/质谱法测定蜂蜜中的5种PAs(非专利文献3)。其中,各方法都需要色谱分离然后用质谱进行检测,尤其是非专利文献1中记载的GC-MS法还需要在MS分析之前进行还原和衍生化步骤。因此,操作烦杂,分析耗时,例如上述非专利文献中记载的方法的分析时间往往需要数分钟、甚至数十分钟。

[0006] 如上可见,现有技术中,在通过质谱分析法进行吡咯里西啶类生物碱的定量分析必须预先进行GC或LC分离步骤,分析时间非常长,另一方面,基于高分辨率质谱技术,虽然有可能实现较为快速的定性分析,但难以期待实现可靠的定量分析。此外,已知的DESI(解吸电喷雾电离)、DART(实时直接分析)等原位质谱都不能实现吡咯里西啶类生物碱的可靠的定量分析。

[0007] 因此,迫切需要开发快速筛选和定量分析中药和/或食物中的吡咯里西啶类生物碱的方法。

[0008] 引证文件列表

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:CN108169387A

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:Alexandra Sixto, Andrés Pérez-Parada, Silvina Niell, Horacio Heinzen. GC-MS and LC-MS/MS workflows for the identification and quantitation of pyrrolizidine alkaloids in plant extracts, a case study: Echinium plantagineum. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2019, 29(4), 500-503

[0013] 非专利文献2: Bharathi Avula, Yan-Hong Wang, Mei Wang, Troy J. Smillie, Ikhlas A. Khan. Simultaneous determination of sesquiterpenes and pyrrolizidine alkaloids from the rhizomes of Petasites hybridus (L.) G.M. et Sch. and dietary supplements using UPLC-UV and HPLC-TOF-MS methods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 70, 53-63

[0014] 非专利文献3: 于海丰, 张兰, 申利, et al. 以液相色谱-质谱/质谱法测定蜂蜜中5种吡咯里西啶类物质的回收率[J]. 食品安全导刊, 2018(15): 75

发明内容

[0015] 发明要解决的问题

[0016] 针对现有技术中存在的难以快速且准确地对吡咯里西啶类生物碱进行定性/定量分析的问题, 本发明要解决的问题在于, 提供一种吡咯里西啶类生物碱的分析方法, 该方法基于探针电喷雾电离方法使利用特定缓冲液稀释后的样品进行电离, 并通过质谱法分析吡咯里西啶类生物碱, 从而在供于质谱分析之前无需进行色谱分离, 能够实现快速且准确的定性和定量分析。

[0017] 用于解决问题的方案

[0018] 本发明中, 使用如下方案解决了快速且准确地定性和定量分析吡咯里西啶类生物碱的技术问题。

[0019] [1] 一种吡咯里西啶类生物碱的分析方法, 其特征在于, 其是针对作为分析对象的样品, 使用探针电喷雾电离质谱法, 分析吡咯里西啶类生物碱的方法,

[0020] 所述方法具备以下步骤:

[0021] 稀释步骤, 在所述样品中添加缓冲液进行稀释; 以及,

[0022] 质谱分析步骤, 将稀释后的所述样品进行探针电喷雾电离, 并导入到质谱分析装置,

[0023] 所述缓冲液含有选自酸解离常数pKa为4.8以下的羧酸和该羧酸的铵盐组成的组中的任一种或两种以上。

[0024] [2] 根据[1]所述的分析方法, 其特征在于, 所述选自酸解离常数pKa为4.8以下的羧酸和该羧酸的铵盐组成的组中的任一种或两种以上在所述缓冲液中的总含量为0.05~0.2重量%。

[0025] [3] 根据[1]或[2]所述的分析方法, 其特征在于, 所述样品为选自由蔬菜、饲料、谷物、茶、中药材、中药提取物、以及中药制剂组成的组中的任一种或两种以上。

[0026] [4] 根据[3]所述的分析方法, 其特征在于, 所述样品包含选自由千里光、款冬花、

佩兰、野马追、紫草、滇紫草、泽兰、鹤虱、紫菀、一点红、红凤菜、琉璃苣、菊三七、白背三七、聚合草组成的组中的任一种或两种以上。

[0027] [5]根据[1]或[2]所述的分析方法,其特征在于,所述样品为选自自由蜂蜜、蜂花粉、蜂王浆、奶及奶制品组成的组中的任一种或两种以上。

[0028] [6]根据[1]或[2]所述的分析方法,其特征在于,所述样品为固体样品,在所述稀释步骤之前,还包括以下步骤:

[0029] 粉碎步骤,将所述固体样品粉碎;以及,

[0030] 提取步骤,在粉碎后的所述固体样品中加入提取溶剂进行提取,得到样品提取液,

[0031] 将所述样品提取液供于所述稀释步骤。

[0032] [7]根据[6]所述的分析方法,其特征在于,所述提取溶剂含有酸解离常数 pK_a 为4.8以下的羧酸。

[0033] [8]根据[1]或[2]所述的分析方法,其特征在于,所述缓冲液含有水和有机溶剂。

[0034] [9]根据[8]所述的分析方法,其特征在于,所述有机溶剂与水的体积比为70/30~20/80。

[0035] [10]根据[8]所述的分析方法,其特征在于,所述有机溶剂为选自自由二甲亚砜、甲酰胺和碳数为2~4的醇组成的组中的任一种或两种以上。

[0036] [11]根据[10]所述的分析方法,其特征在于,所述有机溶剂为异丙醇和/或乙醇。

[0037] [12]根据[1]或[2]所述的分析方法,其特征在于,所述 pK_a 为4.8以下的羧酸为甲酸。

[0038] [13]根据[1]或[2]所述的分析方法,其特征在于,所述吡咯里西啶类生物碱为选自自由野百合碱N-氧化物、阿多尼弗林碱、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N-氧化物、千里光菲灵N-氧化物、克氏千里光碱组成的组中的任一种或两种以上。

[0039] [14]根据[1]或[2]所述的分析方法,其特征在于,所述质谱分析装置为三重四极杆质谱仪。

[0040] [15]根据[1]或[2]所述的分析方法,其特征在于,所述质谱分析步骤中,在多反应监测模式下分析吡咯里西啶类生物碱。

[0041] 发明的效果

[0042] 通过本发明上述技术方案的实施,能够取得如下的有益效果:

[0043] 依据本发明所提供的吡咯里西啶类生物碱的分析方法,采用探针电喷雾电离方法,可以最大限度地减少样品的各种预处理过程,能够通过简单的方法制备待测样品。而且,在供于质谱分析之前无需进行色谱分离,能够实现快速的定性和定量分析,且不需要消耗流动相。进而,与大气压化学电离(APCI)和电喷雾电离(ESI)相比,本发明由于使用探针电喷雾电离,因此不需要消耗脱溶剂气体和雾化气。此外,本发明的分析方法对每个样品或每个化合物的分析时间通常小于20秒(sec)。因此,极大的提高了分析效率、降低了时间/劳力、以及成本。

[0044] 依据本发明所提供的吡咯里西啶类生物碱的分析方法,通过采用探针电喷雾电离方法,从而与DESI、DART等只能做定性和半定量分析的常规原位离子化技术相比,能够对吡咯里西啶碱进行准确的定量分析。

[0045] 依据本发明所提供的吡咯里西啶类生物碱的分析方法,通过使用含有选自酸解离常数 pK_a 为4.8以下的羧酸和该羧酸的铵盐组成的组中的任一种或两种以上的缓冲液,从而吡咯里西啶类生物碱的检测结果具有高灵敏度、良好的线性相关系数,并且重现性好以及回收率高。因此,实现了稳定且准确的定性和定量分析。

附图说明

[0046] 图1为多种吡咯里西啶类生物碱的标准样品的MRM色谱图。

具体实施方式

[0047] 以下,针对本发明的内容进行详细说明。以下所记载的技术特征的说明基于本发明的代表性的实施方式、具体例子而进行,但本发明不限于这些实施方式、具体例子。需要说明的是,本说明书中,“数值A~数值B”所表示的数值范围是指包含端数值A和B的范围。

[0048] 在本发明中,提供了一种吡咯里西啶类生物碱的分析方法,其是针对作为分析对象的样品,使用探针电喷雾电离质谱法,分析吡咯里西啶类生物碱的方法,

[0049] 所述方法具备以下步骤:

[0050] 稀释步骤,在所述样品中添加缓冲液进行稀释;以及,

[0051] 质谱分析步骤,将稀释后的所述样品进行探针电喷雾电离,并导入到质谱分析装置,

[0052] 所述缓冲液含有选自酸解离常数 pK_a 为4.8以下的羧酸和该羧酸的铵盐组成的组中的任一种或两种以上。

[0053] 作为检测对象的样品可以来源于植物,也可以来源于动物。

[0054] 例如,在来源于动物的情况下,典型的是,样品为不含有动物组织和细胞的动物性产品,例如可以为蜂产品、奶及奶制品等。作为该蜂产品,典型的是,在蜜源植物中包含含有吡咯里西啶类生物碱的植物的情况下获得的蜂产品,可列举出蜜蜂、蜂王浆、蜂花粉等。作为上述奶及奶制品,典型的是,作为奶源的牛或羊等动物采食了含有吡咯里西啶类生物碱的植物或饲料的情况下获得的奶及其制品。

[0055] 此外,在来源于植物的情况下,可以源自植物的根、茎、叶、花、果实、种子等任意部位。在一些实施方案中,所述样品可以为选自由蔬菜、饲料、谷物、茶、中药材、中药提取物、以及中药制剂组成的组中的任一种或两种以上。

[0056] 其中,所述蔬菜可以为新鲜蔬菜,也可以为冷冻蔬菜、干燥蔬菜或冻干蔬菜,还可以为烹调后的蔬菜。作为具体例,可列举出:一点红、红凤菜、野苘蒿、琉璃苣、白子菜、聚合草、全缘橐吾、复序橐吾等蔬菜。需要说明的是,药食同源的植物可以根据其形态、用途等适宜地归类为蔬菜或中药材。例如,可以将新鲜的白子菜归类为蔬菜,将干制的白子菜(即白背三七)归类为中药材。作为上述饲料,典型的是,在原料中包含含有吡咯里西啶类生物碱的植物的饲料。作为上述谷物,典型的是,在采收时混有含有吡咯里西啶类生物碱的植物的谷物。作为上述茶,典型的是,使用有意添加或无意混有含有吡咯里西啶类生物碱的植物而制造的茶叶、花草茶、保健茶、调味茶、以及茶饮料。

[0057] 作为上述中药材,对其形态、等级、加工、炮制方法没有特别限定。作为具体例,可列举出:千里光、款冬花、佩兰、野马追、紫草、滇紫草、泽兰、鹤虱、紫菀、菊三七、白背三七

等。需要说明的是,作为中药材的原料的植物本身包含在本发明中的中药材的范畴中。

[0058] 本发明中,中药提取物是指,是以植物或动物等为原料,在中医药理论的指导下,按照对提取的最终产品的用途的需要,经过物理化学提取分离过程,定向获取和浓集植物或动物中的某一种或多种有效成分,而不改变其有效成分结构而形成的产品。本发明中,作为中药提取物的具体例,可列举出:上述列举的中药材中的任一种或两种以上的提取物。中药提取物的形态没有特别限定,可以为干提取物、液体提取物、软提取物等。

[0059] 中药制剂是指,根据药典、制剂规范和其他规定的处方,将中药的原料药物加工制成具有一定规格,可以直接用于防病、治病的药品。本发明中,作为中药制剂的具体例,可列举出:原料中包含上述列举的中药材的中药制剂。所述中药制剂的剂型没有特别限定,可以为片剂、注射剂、气雾剂、丸剂、散剂、膏剂等。

[0060] 从分析吡咯里西啶类生物碱的实际需求的观点出发,样品优选来源于紫草科(Boraginaceae)、菊科的千里光族(Senecioneae)和泽兰族(Eupatorieae)以及豆科的猪屎豆属(Crotalaria)的植物,更优选为红凤菜、白子菜、千里光、紫菀,从获取和处理的容易度出发,进一步优选以干品形态作为中药材市售的白背三七、千里光、紫菀。其中,尤其对于紫菀而言,目前在中药市场上存在其同科植物山紫菀(又名蹄叶橐吾)的干燥根及根茎混充紫菀入药的现象,而山紫菀中吡咯里西啶类生物碱的含量远远高于紫菀,因此分析紫菀中的吡咯里西啶类生物碱在分辨中药的真伪和毒性上具有重要的实用意义。

[0061] 在一些实施方式中,作为本发明的方法所分析的吡咯里西啶类生物碱,可列举出野百合碱(monocrotaline)、野百合碱N-氧化物(Monocrotaline N-Oxide)、阿多尼弗林碱(Adonifoline)、倒千里光碱(retrorsine)、千里光菲灵碱(seneciphyllinine)、千里光宁碱(senecionine)、毛果天芥菜碱(lasiocarpine)、千里光宁N-氧化物(Senecionine N-Oxide)、千里光菲灵N-氧化物(Seneciphylline N-oxide)、克氏千里光碱(Senkirkin)、山冈橐吾碱(clivorine)、蜂斗菜碱(Petasitenine)、全缘千里光碱(integerrimine)、菘蓝千里光碱(Isatidine)、阔叶千里光碱(platyphylline)、亚玛太宁碱(yamataimine)、12-乙酰基亚玛太宁碱(12-acetylyamataimine)、黄樟素(riddelliine)等。

[0062] 从分析吡咯里西啶类生物碱的实际需求的观点出发,本发明的方法所分析的吡咯里西啶类生物碱优选为已被证实具有毒性的吡咯里西啶类生物碱,可列举出野百合碱N-氧化物、阿多尼弗林碱、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N-氧化物、千里光菲灵N-氧化物、克氏千里光碱等。

[0063] 本发明中,分析吡咯里西啶类生物碱的方法具备:稀释步骤,在样品中添加缓冲液进行稀释;以及,质谱分析步骤,将稀释后的所述样品进行探针电喷雾电离,并导入到质谱分析装置。

[0064] 在一些实施方案中,所述样品为固体样品、代表性地为中药材的千里光和紫菀的情况下,可以在稀释步骤之前还包括:粉碎步骤,将所述固体样品粉碎的步骤;以及,提取步骤,在粉碎后的所述固体样品中加入提取溶剂进行提取,得到样品提取液。

[0065] 上述粉碎步骤中所使用的粉碎设备可以适宜使用公知的设备,例如杵臼、乳钵、研磨机、粉碎机等。上述提取溶剂可以根据样品的种类、成分而适宜使用公知的提取溶剂,例如可列举出水、有机溶剂、水与有机溶剂的混合溶剂等。作为提取溶剂,从吡咯里西啶类生物碱的提取效率的观点出发,优选使用水、乙腈、四氢呋喃、丙酮、氯仿、二氯甲烷、二甲亚

砷、甲酰胺、碳数1~8的醇、以及它们的混合溶剂,更优选使用水与碳数1~4的醇的混合溶剂,进一步优选使用水与甲醇的混合溶剂、水与乙醇的混合溶剂,最优选使用水与甲醇的混合溶剂。在使用水与甲醇的混合溶剂的情况下,水与甲醇的比例可以适宜地使用通常的比例,例如可以为10/90~50/50、优选为20/80~40/60。

[0066] 在本发明中,从进一步提高吡咯里西啶类生物碱的提取效率,并且与后续质谱分析步骤中的探针电喷雾电离具有良好的适应性,从而进一步实现本申请的效果的观点出发,所述提取溶剂中优选含有酸解离常数pKa为4.8以下的羧酸。对于该羧酸的含量,没有特别限定,从与探针电喷雾电离的适应性的观点出发,相对于提取溶剂例如为2重量%以下、优选为1重量%以下、更优选为0.05~0.2重量%。从进一步提高与探针电喷雾电离的适应性,进而提高质谱分析的灵敏度和准确性的观点出发,优选pKa为4.75以下的羧酸,更优选pKa为4.75以下的一元羧酸,进一步优选乙酸、甲酸,最优选甲酸。

[0067] 在一些实施方案中,上述提取步骤如下进行:在根据需要粉碎后的固体样品中加入水与甲醇的混合溶剂等提取溶剂,通过例如加热、搅拌、振荡、超声波处理使固体样品中的成分溶解到提取溶剂中,根据需要静置、过滤、离心等处理进行固液分离,将如此得到的液体部分作为样品提取液。

[0068] 在所述提取步骤后,将所述样品提取液供于后续的稀释步骤。需要说明的是,根据样品自身的性质、状态、成分,也可以将样品直接供于稀释步骤,或者,也可以将样品用常规的溶剂溶解后供于稀释步骤。

[0069] 本发明中,稀释步骤中使用的缓冲液含有选自酸解离常数pKa为4.8以下的羧酸和该羧酸的铵盐组成的组中的任一种或两种以上。所述缓冲液可以含有水、有机溶剂、或它们的混合物作为溶剂。从吡咯里西啶类生物碱的溶解性以及质谱分析的灵敏度和准确性的观点出发,所述缓冲液优选含有水和有机溶剂,进一步优选所述有机溶剂为选自由二甲亚砷、甲酰胺和碳数为2~4的醇组成的组中的任一种或两种以上,更进一步优选所述有机溶剂为选自由二甲亚砷、甲酰胺和碳数为2~4的一元醇组成的组中的任一种或两种以上,尤其优选使用异丙醇与水的混合物、乙醇与水的混合物作为溶剂。

[0070] 在一些优选的实施方式中,从80/20~20/80的范围中选择有机溶剂与水的体积比,更优选为70/30~20/80。通过采取这样的体积比,稀释后的样品由于具有适宜的粘度而能够更高效地粘附到探针上,从而提高质谱分析的准确性。在使用乙醇与水的混合物的情况下,从适宜调整稀释后的样品的粘度、提高质谱分析的准确性的观点出发,优选乙醇/水的体积比为70/30~30/70、更优选为68/32~35/65、进一步优选为65/35~45/55、特别优选为62/38~50/50,最优选为60/40。作为另一个例子,在使用异丙醇与水的混合物的情况下,从适宜调整稀释后的样品的粘度、提高质谱分析的准确性的观点出发,优选异丙醇/水的体积比为65/35~25/75、更优选为60/40~30/70、进一步优选为55/45~45/55、特别优选为50/50。

[0071] 本发明通过使用pKa为4.8以下的羧酸和/或该羧酸的铵盐,从而在正离子模式下促进加合离子的生成,能够提高质谱分析的灵敏度和准确性。从进一步发挥本发明的效果的观点出发,缓冲液优选含有pKa为4.8以下的羧酸。

[0072] 作为本发明中使用的pKa为4.8以下的羧酸,可列举出乙酸、甲酸、乙二酸、一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸等具有挥发性的羧酸。从进一步提高质谱分析的灵敏度和准确性的

观点出发,优选pKa为4.75以下的羧酸,更优选pKa为4.75以下的一元羧酸,进一步优选乙酸、甲酸,最优选甲酸。所述pKa为4.8以下的羧酸的浓度可以采取质谱分析中通常采用的浓度,例如可以为0.02~0.8wt%、优选为0.04~0.5wt%、更优选为0.06~0.3wt%、进一步优选为0.08~0.2wt%。

[0073] 本发明中,稀释步骤中的稀释倍数没有特别限定,可以根据样品种类、作为分析对象的吡咯里西啶类生物碱的种类和预估浓度、分析方法而适宜确定。在一些实施方式中,以作为分析对象的吡咯里西啶类生物碱的稀释后浓度成为0.2ppb~1ppm的范围的方式进行稀释,并且采用内标法进行质谱分析。此外,在一些实施方式中,以作为分析对象的吡咯里西啶类生物碱的稀释后浓度成为0.2ppm~1000ppm的范围的方式进行稀释,并且采用外标法进行质谱分析。

[0074] 本发明中,质谱分析步骤中,作为分析设备,例如可以使用具备探针电喷雾离子源(PESI)的质谱仪。从分析灵敏度的观点出发,所述质谱仪优选为三重四极杆质谱仪。作为分析设备的具体例,可列举出株式会社岛津制作所制造的DPiMS-2020原位探针离子化质谱仪、在三重四极杆质谱仪(例如株式会社岛津制作所制造的LCMS-8060、LCMS-8045或LCMS-8050)上安装株式会社岛津制作所制造的探针电喷雾电离装置而成的设备。

[0075] 质谱分析步骤中,探针电喷雾电离可以采用正离子模式或负离子模式中的任一种,从灵敏度的观点出发,优选采用正离子模式。在一些优选的实施方式中,质谱分析步骤中,可以在多反应监测模式下进行吡咯里西啶类生物碱的定性/定量分析。多反应监测模式中所使用的检测条件可以使用现有公知的条件。

[0076] 上述探针电喷雾离子源的放电电压为通常的电压即可,典型的是 $\pm 0.5\text{kV}$ ~ $\pm 4\text{kV}$,但不限于此。上述探针电喷雾离子源中使用的探针没有特别限定,可以使用现有公知的用于探针电喷雾电离质谱法的探针,例如可以使用株式会社岛津制作所制造的17928A1探针。从以高准确性分析吡咯里西啶类生物碱的观点出发,优选探针的针尖直径为300nm~5 μm 、更优选为350nm~3 μm 、进一步优选为400nm~2 μm 。在放电电压为 $\pm 1.5\text{kV}$ ~ $\pm 3.5\text{kV}$ 、且探针的针尖直径为450nm~1 μm 时,吡咯里西啶类生物碱表现出稳定且较高的信号强度,因此特别优选。

[0077] 另外,本发明中,质谱分析步骤中,可以使用归一化法、内标法、外标法及标准加入法等任意的分析方法。本发明中,若采用外标法,则标准曲线的线性相关系数通常为0.9~0.99。另一方面,若采用内标法,则野百合碱N-氧化物、阿多尼弗林碱、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N-氧化物、千里光菲灵N-氧化物、克氏千里光碱等多种吡咯里西啶类生物碱均可获得线性相关系数高的标准曲线,例如 R^2 为0.99以上、在一些情况下为0.999以上,此外,灵敏度和检测限也通常优于外标法。因此,从减少基质效应、提高分析的灵敏度、准确性的观点出发,优选采用内标法进行吡咯里西啶类生物碱的分析。对于吡咯里西啶类生物碱的分析,可以使用现有技术中常用的内标物质,从低成本且易购买的观点出发,优选使用野百合碱。

[0078] 实施例

[0079] 以下说明本发明的实施例,但本发明不限于下述的实施例。

[0080] 本实施例采用探针电喷雾离子源串联三重四极杆质谱仪分析中药材千里光、紫菀中的野百合碱N-氧化物、阿多尼弗林碱、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N-氧化物、千里光菲灵N-氧化物、克氏千里光碱。

[0081] 以下具体说明装置构成以及检测的条件、步骤和结果。

[0082] 本实施例中,按照如下的步骤将作为样品的千里光、紫菀分别破碎后,用甲醇水提取,经过稀释后供于探针电喷雾离子源串联三重四极杆质谱仪,通过内标法进行分析。

[0083] (1)准确称取0.2g样品于50mL离心管;

[0084] (2)加入10mL甲醇(0.1wt%甲酸),称重,超声提取40min,

[0085] (3)用甲醇(0.1wt%甲酸)补足损失的重量;

[0086] (4)在4000rpm下离心10min;

[0087] (5)取50 μ L上清液用乙醇/水(体积比60/40,0.1wt%甲酸)溶液稀释至1mL;

[0088] (6)取9.0 μ L稀释液进样分析。

[0089] 装置及其工作条件

[0090] 本实施例中,在株式会社岛津制作所制造的三重四极杆质谱仪LCMS-8060上安装株式会社岛津制作所制造的探针电喷雾电离装置,构成探针电喷雾离子源串联三重四极杆质谱仪(以下也称为DPiMS-8060),作为质谱分析装置。

[0091] 探针电喷雾离子源设定为如下的工作条件。

[0092] 取样时间:50sec 放电电压:2.3kV(+)/3.0kV(-)

[0093] 取样位置:46.0mm 探针清洗:0.05min(+)/0.05min(-)

[0094] 离子化时间:220msec 探针频率:2.78Hz

[0095] 探针型号:17928A1(株式会社岛津制作所制造),针尖直径700nm

[0096] 三重四极杆质谱仪设定为如下的工作条件。

[0097] 离子源:PESI(+) DL管温度:250 $^{\circ}$ C

[0098] 接口电压:2.5kV 加热模块温度:30 $^{\circ}$ C

[0099] 扫描模式:多反应监测(MRM) MRM参数:见表1

[0100] 表1

化合物名称	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
克氏千里光碱	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

[0102] *为定量离子

[0103] 图1示出内标(野百合碱)、野百合碱N-氧化物、阿多尼弗林碱、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N-氧化物、千里光菲灵N-氧化物、克氏千里光碱的标准样品的MRM色谱图。将野百合碱N-氧化物、阿多尼弗林碱、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N-氧化物、千里光菲灵N-氧化物、克氏千里光碱的标准曲线回归方程、线性相关系数、线性范围、检出限、定量限示于如下的表2。

[0104] 表2

化合物	校准曲线	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
[0105] 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
克氏千里光碱	$Y = 1.566X + 0.050$	0.999	0.2-50	0.34	1.02

[0106] 表2中,线性范围(单位 $\mu\text{g/L}$)表示分析步骤中的添加有内标的溶液浓度的线性范围,检出限和定量限(单位 $\mu\text{g/g}$)表示分析方法整体(即包括提取、稀释和分析步骤)的检出限和定量限。

[0107] 由表2可见,线性相关系数高于0.996、检出限处于0.04~0.37 $\mu\text{g/g}$ 、定量限为0.11~1.10 $\mu\text{g/g}$,表现出高灵敏度。其中,

[0108] 使用上述标准曲线,分别在1.00 $\mu\text{g/L}$ 、30.0 $\mu\text{g/L}$ (阿多尼弗林碱除外,其浓度分别为0.09 $\mu\text{g/L}$ 、2.3 $\mu\text{g/L}$)的浓度下测定各吡咯里西啶类生物碱的标准样品精密度($n=7$),将结果示于表3。

[0109] 表3

化合物	浓度 ($\mu\text{g/L}$)	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
阿多尼弗林碱	0.09	0.07	0.09	0.06	0.08	0.08	0.07	0.06	0.07	15.6
	2.3	1.83	2.14	2.28	2.05	2.08	2.15	2.13	2.09	6.5
倒千里光碱	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
千里光菲灵碱	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
[0110] 千里光宁碱	1.00	0.93	0.67	0.79	0.92	0.73	0.92	0.98	0.85	13.8
	30.0	27.5	29.2	29.1	30.0	29.0	27.6	27.7	28.6	3.40
毛果天芥菜碱	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 N-氧化物	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
千里光菲灵 N-氧化物	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
克氏千里光碱	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

[0111] 在千里光和紫菀样品中,加入100ppb标准溶液和5.0ppb内标(野百合碱),然后按照样品前处理方法提取并分析,将结果示于表4。其中,100ppb加标对应干药材中的含量为5 $\mu\text{g/g}$,低于中国药典限值(40 $\mu\text{g/g}$)。

[0112] 表4

化合物	药材	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
克氏千里光碱	千里光	93	84	96	99	102	91	94	84-102
	紫菀	93	87	90	99	95	104	107	87-107

[0114] —表示未测定

[0115] 由表4可见,本实施例中,对于千里光、紫菀,通过简单的提取、以及使用特定缓冲液的稀释处理后,使用本发明的基于探针电喷雾电离质谱法的分析方法测定了野百合碱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N-氧化物、千里光菲灵N-氧化物、克氏千里光碱,其结果,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。

[0116] 此外,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。具体而言,通过DPiMS-8060对各吡咯里西啶类生物碱进行7次平行测定,将分析结果及其平均值示于下述表5。通过LC-MS/MS对各吡咯里西啶类生物碱进行2次平行测定,将分析结果及其平均值示于下述表6。将通过DPiMS-8060、LC-MS/MS所得的分析结果的平均值记载于下述表7,并且,基于这些平均值按以下标准进行评价,将所得到的结果示于表7。

[0117] G-良好:定性结果确认,DPiMS与LCMS的比值小于5;

[0118] M-中等:定性结果确认,DPiMS与LCMS的比值大于5;

[0119] B-不良:未确认存在。

[0120] 表5

化合物	药材	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	平行 7	均值
									($\mu\text{g/g}$)
野百合碱 N-氧化物	千里光	0.59	0.52	0.60	0.79	0.52	0.78	0.57	0.62
	紫菀	0.52	0.55	0.51	0.58	0.65	0.64	0.76	0.60
阿多尼弗林碱	千里光	21.5	24.6	23.3	23.1	21.5	21.1	22.5	22.5
	紫菀	N.D	0.07	0.05	0.06	0.06	0.04	0.06	0.06
倒千里光碱	千里光	0.55	0.49	0.53	0.54	0.56	0.56	0.66	0.55
	紫菀	2.69	2.90	3.00	2.63	3.07	2.91	2.71	2.84
千里光菲灵碱	千里光	0.70	0.66	0.70	0.65	0.86	0.67	0.84	0.73
	紫菀	1.19	1.18	1.55	1.10	1.54	1.44	1.19	1.31
千里光宁碱	千里光	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	紫菀	0.61	0.73	0.53	0.46	0.51	0.53	0.50	0.55
毛果天芥菜碱	千里光	0.62	0.39	0.47	0.51	0.44	0.52	0.39	0.48
	紫菀	0.31	0.47	0.60	0.47	0.46	0.44	0.37	0.44
千里光宁 N-氧化物	千里光	0.96	0.89	0.90	0.76	0.67	0.88	0.80	0.84
	紫菀	2.38	2.31	2.07	2.12	1.98	2.03	1.89	2.11
千里光菲灵 N-氧化物	千里光	1.22	1.40	1.11	0.90	0.98	1.39	1.30	1.19
	紫菀	1.43	1.53	1.48	1.53	0.98	1.44	1.66	1.54
克氏千里光碱	千里光	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	紫菀	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

[0122] N.D表示未检出(not detected)

[0123] 表6

化合物	药材	LC-MS/MS ($\mu\text{g/g}$)		
		1	2	ave.
野百合碱 N-氧化物	千里光	N.D	N.D	N.D
	紫菀	N.D	N.D	N.D
阿多尼弗林碱	千里光	21.8	22.0	21.9
	紫菀	N.D	N.D	N.D
倒千里光碱	千里光	0.11	0.10	0.10
	紫菀	0.16	0.16	0.16
千里光菲灵碱	千里光	0.07	0.07	0.07
	紫菀	0.17	0.20	0.19
千里光宁碱	千里光	N.D	N.D	N.D
	紫菀	0.34	0.31	0.32
毛果天芥菜碱	千里光	0.03	0.03	0.03
	紫菀	N.D	0.02	0.02
千里光宁 N-氧化物	千里光	N.D	N.D	N.D
	紫菀	0.23	0.23	0.23
千里光菲灵 N-氧化物	千里光	N.D	N.D	N.D
	紫菀	0.52	0.56	0.54
克氏千里光	千里光	N.D	N.D	N.D
	紫菀	N.D	N.D	N.D

[0125] N.D表示未检出(not detected)

[0126] 表7

化合物	药材	DPiMS ($\mu\text{g/g}$)	LC-MS/MS ($\mu\text{g/g}$)	评价结果
		ave. (n=7)	ave. (n=2)	
野百合碱 N-氧化物	千里光	0.62	N.D	B
	紫菀	0.60	N.D	B
阿多尼弗林碱	千里光	22.5	21.9	G
	紫菀	0.06	N.D	G
倒千里光碱	千里光	0.55	0.10	G
	紫菀	2.84	0.16	M
千里光菲灵碱	千里光	0.73	0.07	M
	紫菀	1.31	0.19	G
千里光宁碱	千里光	N.D	N.D	G
	紫菀	0.55	0.32	G
毛果天芥菜碱	千里光	0.48	0.03	M
	紫菀	0.44	0.02	M
千里光宁 N-氧化物	千里光	0.84	N.D	B
	紫菀	2.11	0.23	M
千里光菲灵 N-氧化物	千里光	1.19	N.D	B
	紫菀	1.54	0.54	G
克氏千里光碱	千里光	N.D	N.D	G
	紫菀	N.D	N.D	G

[0128] N.D表示未检出(not detected)

[0129] 由上述表5可见,与LC-MS/MS的测定结果相比,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。可知,在实施例5中,基于探针电喷雾电离方法使利用特定缓冲液稀释后的样品进行电离,并通过质谱法分析吡咯里西啶类生物碱,从而实现了快速且准确的定性和定量分析。

[0130] 产业上的可利用性

[0131] 依据本发明的分析方法,能够简化样品前处理的工艺,实现高灵敏度、高准确性且更快捷的检测,在分析吡咯里西啶类生物碱的用途中有益。

[0132] 上述已经描述了本发明的各实施例,上述说明是示例性的,并非穷尽性的,并且也不限于所披露的各实施例。在不偏离所说明的各实施例的范围和精神的情况下,对于本技术领域的普通技术人员来说许多修改和变更都是显而易见的。

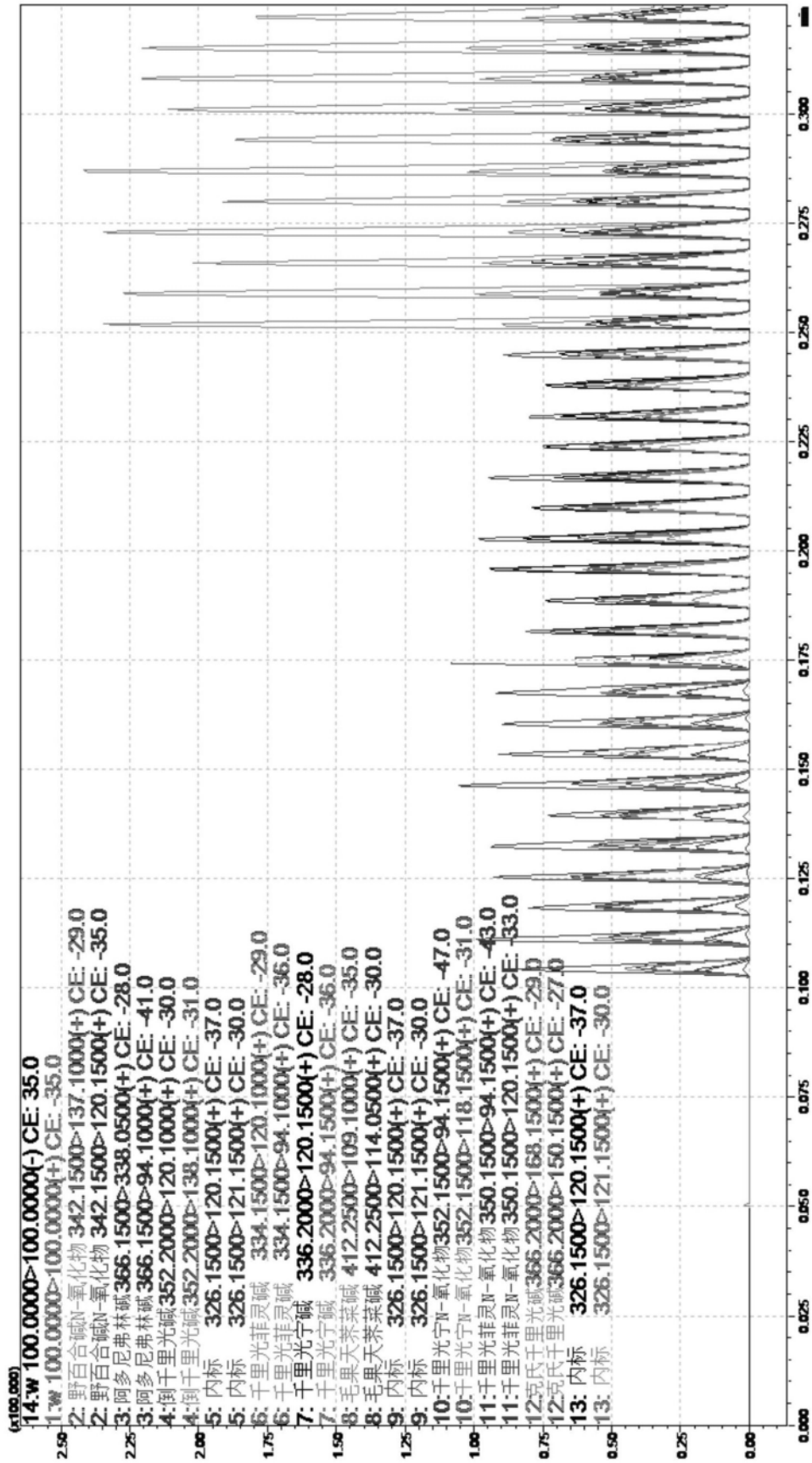


图1