

## 不同产地菊三七根中 6 个吡咯里西啶生物碱成分的比较

刘 艳, 鲜 新, 汪泓江, 李密密, 任冰如, 吕 寒<sup>①</sup>, 陈 剑, 李维林

(江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省抗糖尿病药物筛选技术服务中心, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 采用超高效液相-四级杆-飞行时间串联质谱技术(UPLC-Q-TOF/MS)检测 5 个产地菊三七 [*Gynura japonica* (Thunb.) Juel.] 根中 6 个吡咯里西啶生物碱(PAs) 成分的含量差异。结果显示: 不同产地菊三七根中 PAs 总含量差异显著( $P < 0.05$ ), 其中, 云南昆明产菊三七根中的 PAs 总含量最高( $3\ 107.12\ \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 而四川乐山产菊三七根中的 PAs 总含量最低( $310.47\ \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )。在 5 个产地菊三七根中均检出千里光菲灵 *N*-氧化物和千里光宁 *N*-氧化物。除湖北恩施外, 其余产地菊三七根中并未检出全部 6 个 PAs 成分。研究结果显示: 不同产地菊三七根中 PAs 的种类和含量均存在较大差异。

**关键词:** 菊三七; 吡咯里西啶生物碱(PAs); 超高效液相-四级杆-飞行时间串联质谱技术(UPLC-Q-TOF/MS)

**中图分类号:** Q946.88; R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7895(2022)02-0082-03

**DOI:** 10.3969/j.issn.1674-7895.2022.02.09

**Comparison on six pyrrolizidine alkaloids in roots of *Gynura japonica* from different origins** LIU Yan, XIAN Xin, WANG Hongjiang, LI Mimi, REN Bingru, LYU Han<sup>①</sup>, CHEN Jian, LI Weilin (Jiangsu Provincial Service Center for Anti-diabetic Drugs Screening, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2022, 31(2): 82-84

**Abstract:** The differences of contents of six pyrrolizidine alkaloids (PAs) in roots of *Gynura japonica* (Thunb.) Juel. from five origins were detected by using ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometer (UPLC-Q-TOF/MS). The results show that there are significant ( $P < 0.05$ ) differences in total contents of PAs in roots of *G. japonica* from different origins, in which, total content of PAs in roots of *G. japonica* from Kunming of Yunnan is the highest ( $3\ 107.12\ \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), while that in roots of *G. japonica* from Leshan of Sichuan is the lowest ( $310.47\ \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Seneciphylline *N*-oxide and senecionine *N*-oxide are detected in roots of *G. japonica* from all five origins. Except for Enshi of Hubei, not all six PAs are detected in roots of *G. japonica* from the other origins. It is suggested that there are great differences in types and contents of PAs in roots of *G. japonica* from different origins.

**Key words:** *Gynura japonica* (Thunb.) Juel.; pyrrolizidine alkaloids (PAs); ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometer (UPLC-Q-TOF/MS)

菊三七 [*Gynura japonica* (Thunb.) Juel.] 又名土三七, 为多年生草本植物<sup>[1]</sup>, 全草可入药, 具有散瘀止血、解毒消肿的功效<sup>[2]</sup>。菊三七的根与传统药用植物三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen ex C. Chow et W. G. Huang] 的干燥根十分相似, 患者误服后多会出现中毒现象<sup>[3]</sup>。

吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs) 成分在菊三七属 (*Gynura* Cass.) 植物中广泛分布, 可引起多种肝损伤<sup>[4]</sup>。为了探明不同产地菊三七中 PAs 的成分差异, 本研究采用超高效液相-四级杆-飞行时间串联质谱技术 (UPLC-Q-TOF/MS) 对湖北、四川和云南不同产地野生菊三七中 6 个代表性 PAs 成分进行检测, 比较了菊三七根中不同 PAs 成分在产地间的差异, 以期对菊三七的安全使用提供实验依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

供试野生菊三七的根于 2018 年 8 月至 9 月分别采自湖北恩施 (东经  $109^{\circ}32'23.96''$ 、北纬  $30^{\circ}09'57.56''$ ), 四川乐山 (东经  $103^{\circ}26'24.86''$ 、北纬  $29^{\circ}34'53.62''$ ) 及云南的文山 (东经  $104^{\circ}14'10.93''$ 、北纬  $24^{\circ}10'38.50''$ )、武定 (东经  $102^{\circ}22'13.04''$ 、北纬  $25^{\circ}33'49.43''$ ) 和昆明 (东经  $102^{\circ}49'35.26''$ 、北纬  $24^{\circ}53'39.70''$ ), 由江苏省中国科学院植物研究所任冰如研究员鉴定。每个产地挖取 6~10 个菊三七根, 洗去根表面浮土, 切片; 于  $40\ ^{\circ}\text{C}$  烘干至恒质量后粉碎, 过 100 目筛; 置于  $-4\ ^{\circ}\text{C}$  冰

收稿日期: 2021-09-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31770366)

作者简介: 刘 艳 (1971—), 女, 江苏南京人, 大专, 实验师, 主要从事药用植物资源的开发与利用研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: hanlyu@cnbg.net

引用格式: 刘 艳, 鲜 新, 汪泓江, 等. 不同产地菊三七根中 6 个吡咯里西啶生物碱成分的比较 [J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(2): 82-84.

箱中保存、备用。

主要仪器:Agilent 1260/6530 UPLC-Q-TOF/MS 超高效液相-四级杆-飞行时间串联质谱仪(美国 Agilent 公司);Direct-Q<sup>®</sup> UV 超纯水机(美国 Millipore 公司);SCX 固相萃取柱(美国 Phenomenex 公司);FG-24 固相萃取仪(天津市富城达科技有限公司)。

主要试剂:千里光菲灵碱(批号 Q-058-190329)和千里光宁(批号 Q-064-190328)标准品购于南京春秋生物工程有限公司,全缘千里光碱(批号 88040538)、倒千里光碱(批号 88040511)、千里光宁 *N*-氧化物(批号 88432657)和千里光菲灵 *N*-氧化物(批号 88432665)标准品购于德国 PhytoLab 公司,所有标准品的纯度均大于 98%;甲醇和乙腈购于美国 Tedia 公司,氨水购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,3 个试剂均为色谱纯。

## 1.2 方法

1.2.1 分析条件 色谱分析条件:Acquity UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm,美国 Waters 公司)。以乙腈为流动相 A、体积分数 0.1% 甲酸为流动相 B 进行梯度洗脱,洗脱程序如下:0~4 min,体积分数 10% A;4~7 min,体积分数 10%~15% A;7~9 min,体积分数 15%~30% A;9~15 min,体积分数 30%~90% A。柱温 40 °C,流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 5 μL,检测波长 210 nm,后运行时间 5 min。

质谱分析条件:电喷雾离子源(ESI),正离子模式;质量扫描范围  $m/z$  100~1 000;雾化器压力 345 kPa;干燥气(N<sub>2</sub>)流速 10 mL·min<sup>-1</sup>,温度 350 °C;毛细管电压 4 000 V;碎裂电压 175 V。用 Agilent MassHunter B.05.00 工作站处理相关实验数据。

1.2.2 标准曲线绘制 精确称取倒千里光碱标准品 1.05 mg、千里光菲灵碱标准品 1.02 mg、千里光菲灵 *N*-氧化物标准品 1.60 mg、全缘千里光碱标准品 1.67 mg、千里光宁标准品 2.14 mg、千里光宁 *N*-氧化物标准品 0.97 mg,分别用甲醇溶解并定容至 5 mL,作为标准品母液;用甲醇将每个标准品母液依次稀释 10、50、100、250、500 和 1 000 倍;取等体积相同稀释倍数的 6 个标准品溶液,混匀后制成混合标准品溶液。按照上述色谱和质谱分析条件进样分析。以峰面积为纵坐标( $y$ )、标准品质量浓度为横坐标( $x$ )绘制标准曲线。倒千里光碱回归方程为  $y=2\ 256x+579\ 737$  ( $r^2=0.999\ 0$ ),线性范围 30~30 000 ng·mL<sup>-1</sup>;千里光菲灵碱回归方程为  $y=3\ 060x-349\ 124$  ( $r^2=0.999\ 9$ ),线性范围 29~29 143 ng·mL<sup>-1</sup>;千里光菲灵 *N*-氧化物回归方程  $y=2\ 722x+1\ 361\ 790$  ( $r^2=0.999\ 0$ ),线性范围 46~45 714 ng·mL<sup>-1</sup>;全缘千里光碱回归方程为  $y=9\ 007x-168\ 200$  ( $r^2=0.999\ 8$ ),线性范围 48~47 714 ng·mL<sup>-1</sup>;千里光宁回归方程为  $y=6\ 484x-17\ 034$  ( $r^2=0.999\ 1$ ),线性范围 61~61 142 ng·mL<sup>-1</sup>;千里光宁 *N*-氧化物回归方程为  $y=1\ 546x+1\ 176\ 912$  ( $r^2=0.995\ 9$ ),线性范围 22~22 571 ng·mL<sup>-1</sup>。

1.2.3 样品溶液制备及检测分析 取不同产地菊三七根粉末

样品约 1.0 g,精确称量后加入体积分数 90% 乙醇溶液 30.0 mL,40 kHz 超声提取 1 h;过滤,滤液于 50 °C 减压浓缩至无醇;浓缩液用 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 稀硫酸溶液 5.0 mL 溶解后,在 4 °C 条件下 8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min;将上清液加入 SCX 固相萃取柱中,分别用 12 mL 甲醇和 12 mL 蒸馏水冲洗,弃洗脱液;用 10 mL  $V(\text{氨水}):V(\text{甲醇})=3:7$  的混合溶液洗脱 SCX 固相萃取柱,收集洗脱液,蒸干后用甲醇溶解并定容至 25 mL,所得溶液即样品溶液。每个产地重复取样 3 次,分别按照上述方法制备样品溶液。所有样品溶液均按照上述色谱和质谱分析条件进样分析。

### 1.2.4 方法学考察

1.2.4.1 精密度的考察 将混合标准品溶液连续进样 6 次,结果显示 6 个标准品峰面积的  $RSD$  值为 3.51%~7.61%,表明精密程度良好。

1.2.4.2 稳定性考察 取湖北恩施样品溶液,分别在样品溶液制备后 0、2、4、8、12 和 24 h 进样,记录不同时间的色谱峰面积。结果显示各峰面积的  $RSD$  值为 4.86%~9.50%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

1.2.4.3 重复性考察 取湖北恩施菊三七根粉末 6 份,每份约 1.0 g,精确称量后按照上述方法制备样品溶液,并按照上述色谱和质谱分析条件进样分析。结果显示各样品溶液峰面积的  $RSD$  值分别为 5.63%~10.12%,表明该方法重复性良好。

1.2.4.4 加样回收率考察 取湖北恩施菊三七根粉末 3 份,每份约 0.5 g,精确称量后分别精密加入 0.5 g 样品中含有的待测标准品量,按照上述方法制备样品溶液,并按照上述色谱和质谱分析条件进样分析,计算各成分的加样回收率及峰面积的  $RSD$  值。结果显示各标准品的加样回收率为 98.15%~100.20%,峰面积的  $RSD$  值为 4.27%~7.54%,表明该方法加样回收率较高。

## 1.3 数据处理

采用 EXCEL 2016 和 GraphPad Prism 7 软件对数据进行处理和单因素方差分析(one-way ANOVA)。

## 2 结果和分析

不同产地菊三七根中吡咯里西啶生物碱(PAs)成分含量的比较结果见表 1。由表 1 可见,不同产地菊三七根中 PAs 的成分组成及含量均存在一定差异。千里光菲灵 *N*-氧化物和千里光宁 *N*-氧化物在 5 个产地菊三七根中均存在,倒千里光碱仅存在于湖北恩施产菊三七根中;而千里光菲灵碱在云南文山产菊三七根中未检出,千里光宁在四川乐山产菊三七根中未检出,全缘千里光碱在云南文山和云南武定产菊三七根中未检出。云南昆明产菊三七根中千里光菲灵 *N*-氧化物含量最高(2 098.45 μg·g<sup>-1</sup>),全缘千里光碱含量最低(7.20 μg·g<sup>-1</sup>)。除云南昆明外,其余 4 个产地菊三七根中千里光宁 *N*-氧化物含量最高;湖北恩施、四川乐山和云南武定产菊三七

根中千里光菲灵 *N*-氧化物含量最低,而云南文山产菊三七根中千里光宁含量最低。

各产地菊三七根中 PAs 总含量由高到低依次为云南昆

明、云南文山、湖北恩施、云南武定、四川乐山。供试 6 个产地菊三七根中 PAs 总含量的最高值约为最低值的 10 倍,且在不同产地间存在显著( $P<0.05$ )差异。

表 1 不同产地菊三七根中吡咯里西啶生物碱(PAs)成分含量的比较( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>

Table 1 Comparison on contents of pyrrolizidine alkaloids (PAs) in roots of *Gynura japonica* (Thunb.) Juell. from different origins ( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>

产地 Origin	含量/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) Content							合计 Total
	倒千里光碱 Retrorsine	千里光菲灵碱 Seneciophylline	千里光菲灵 <i>N</i> -氧化物 Seneciophylline <i>N</i> -oxide	全缘千里光碱 Integerrimine	千里光宁 Senecionine	千里光宁 <i>N</i> -氧化物 Senecionine <i>N</i> -oxide		
湖北恩施 Enshi of Hubei	13.89±0.31	51.05±0.64a	0.39±0.01c	3.65±0.10c	15.35±0.53c	1 423.48±7.31b	1 507.81±6.87c	
四川乐山 Leshan of Sichuan	—	4.87±0.54d	0.18±0.01c	37.19±0.76a	—	268.24±1.68e	310.47±1.99e	
云南文山 Wenshan of Yunnan	—	—	248.28±2.34b	—	19.28±0.23b	1 635.64±5.57a	1 903.20±6.82b	
云南武定 Wuding of Yunnan	—	20.53±1.04c	1.34±0.04c	—	11.58±0.53d	1 079.79±7.55c	1 113.24±9.22d	
云南昆明 Kunming of Yunnan	—	34.21±0.46b	2 098.45±6.85a	7.20±0.09b	23.75±1.10a	943.51±5.73d	3 107.12±8.89a	

<sup>1)</sup> 同列中不同小写字母表示在不同产地间差异显著( $P<0.05$ ) Different lowercases in the same column indicate the significant ( $P<0.05$ ) difference among different origins. —: 未检出 Undetected.

### 3 讨 论

吡咯里西啶生物碱(PAs)是一类在自然界中广泛分布的天然次生代谢产物,具有肝毒性<sup>[5]</sup>,其主要毒性靶器官是肝脏,还可引起肺、肾等器官损伤<sup>[6]</sup>。供试各产地菊三七根中均含有大量的 PAs,总含量达  $310.47\sim 3\ 107.12\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,且 PAs 含量在不同产地间差异显著。刘贺之等<sup>[7]</sup>认为,PAs 既是菊三七的有效止血成分,又是菊三七的毒性成分,如何控制菊三七的用药剂量是临床应用研究的重点。

研究表明:生长环境对植物次生代谢产物累积有较大影响<sup>[8]</sup>。本研究中,不同省份及同一省份不同地区菊三七根中的 PAs 种类和含量均存在较大差异,该结果可能与各产地的生境差异或样本数量较少(四川和湖北均只有 1 个样品)有关。在后期研究中应增加不同产地的样本数量,以探明生境对菊三七根中 PAs 形成的作用规律。另外,菊三七为多年生根用药材,很多多年生根用药材的有效成分含量会随生长年限发生明显变化<sup>[9,10]</sup>,而本研究使用的菊三七根来自野生植株,样株的生长年限可能存在较大差异,因此,关于生长年限对菊三七根中 PAs 累积的影响也需深入研究。

#### 参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第七十七卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 312-313.

- [2] 李小军,覃欢,刘欢. 菊三七属植物的民族药用和食用价值[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2015, 34(4): 62-67.
- [3] 叶天和,梁惠民,叶进,等. 土三七致肝窦阻塞综合征[J]. 中华介入放射学电子杂志, 2014, 2(4): 53-57.
- [4] DAI N, YU Y C, REN T H, et al. *Gynura* root induces hepatic veno-occlusive disease: a case report and review of the literature [J]. World Journal of Gastroenterology, 2007, 13(10): 1628-1631.
- [5] 吴豪,钟荣玲,夏智,等. 潜在肝毒性中药的成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(17): 3209-3217.
- [6] HUANG Z, CHEN M, ZHANG J, et al. Integrative analysis of hepatic microRNA and mRNA to identify potential biological pathways associated with monocrotaline-induced liver injury in mice [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2017, 333: 35-42.
- [7] 刘贺之,庞健,王增岭,等. 菊三七与参三七对血小板超微结构影响的研究[J]. 药学学报, 1982, 17(11): 801-808.
- [8] 苏文华,张光飞,李秀华,等. 植物药材次生代谢产物的积累与环境的关系[J]. 中草药, 2005, 36(9): 1415-1418.
- [9] 王振峰,高云涛,张文斌,等. 不同生长年限三七中总皂苷含量的变化特征[J]. 安徽农业科学, 2012, 4(15): 8458-8459, 8463.
- [10] 姜先刚,张惠,王泽玉,等. 不同产地、年限人参中 8 种皂苷含量的比较[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(11): 2764-2766.

(责任编辑:佟金凤)