

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.16.021

超高效液相色谱串联质谱法测定中成药中马兜铃酸 I 含量*

周春玲, 刘天竹, 李晓欣, 康 强, 李成森, 赫爱平[△]

(辽宁省检验检测认证中心·辽宁省药品检验检测院, 辽宁 沈阳 110036)

摘要:目的 建立测定 13 种中成药中马兜铃酸 I 含量的超高效液相色谱串联质谱法。方法 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸溶液(含 10 mmol/L 甲酸铵)–乙腈(梯度洗脱), 流速 0.3 mL/min, 柱温 25 °C, 离子源为电喷雾离子源(ESI), 扫描方式为正离子扫描, 多反应离子监测(MRM)模式。结果 马兜铃酸 I 质量浓度在 0.046 55~9.310 00 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2=0.999\ 9$, $n=5$); 定量限、检测限分别为 0.05 ng 和 0.015 ng; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率为 100.49%, RSD 为 2.29% ($n=6$)。结论 所建立的方法专属性强, 快速、灵敏, 可用于中成药中马兜铃酸 I 的含量测定。

关键词:马兜铃酸 I; 超高效液相色谱串联质谱法; 中成药; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)16-0081-04

Content Determination of Aristolochic Acid I in Chinese Patent Medicines by UPLC-MS/MS

ZHOU Chunling, LIU Tianzhu, LI Xiaoxin, KANG Qiang, LI Chengsen, HE Aiping

(Liaoning Inspection, Examination & Certification Centre · Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang, Liaoning, China 110036)

Abstract: Objective To establish an ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS) method for the content determination of aristolochic acid I in 13 kinds of Chinese patent medicines. **Methods** The chromatographic column was ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid (containing 10 mmol/L ammonium formate) with gradient elution, the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 25 °C. The positive ion scanning mode and multiple reaction monitoring(MRM) mode were adopted with positive electrospray ionization(ESI). **Results** The linearity range of aristolochic acid I was 0.046 55-9.310 00 μg/mL ($R^2=0.999\ 9$, $n=5$). The limit of quantification (LOQ) and limit of detection(LOD) of aristolochic acid I were 0.05 ng and 0.015 ng, respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%. The average recovery of aristolochic acid I was 100.49% with RSD of 2.29% ($n=6$). **Conclusion** The method is specific, rapid, sensitive, which can be used for the content determination of aristolochic acid I in Chinese patent medicines.

Key words: aristolochic acid I; UPLC-MS/MS; Chinese patent medicines; content determination

马兜铃科 Aristolochiaceae 马兜铃属 *Aristolochia* L. 植物具有广泛的药用价值, 其所含的马兜铃酸类成分具有抗感染、抗肿瘤活性及增强吞噬细胞活性的作用。20 世纪 80 年代起, 有研究发现, 马兜铃酸具有很强的肾毒性和

致基因突变作用^[1-4]。欧洲发现了因服用含马兜铃酸中药致肾衰竭的病例, 美英等国先后禁止使用含马兜铃酸的原料和制品, 原国家食品药品监督管理局先后取消了青木香、广防己和关木通的标准, 并要求对含马兜铃

*基金项目: 国家食品药品监督管理局项目[食药监办药化监〔2018〕22 号]。

第一作者: 周春玲, 女, 博士研究生, 主任药师, 研究方向为中药物质基础与质量分析, (电子信箱)zhouchunling@163.com。

[△]通信作者: 赫爱平, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品检验, (电话)024-31266505(电子信箱)aphe89@sina.com。

2391-2394.
[9] 孙 茜, 袁 浩, 徐艳梅, 等. QuEChERS 结合气相色谱-串联质谱法测定吐根药材中 38 种农药残留[J]. 中国药业, 2018, 27(10):19-22.
[10] 邹桂欣, 尤献民, 王光函. 伸筋草中重金属和农药残留量分析[J]. 中国药业, 2012, 21(24):49-50.
[11] 吴万征, 杨柳清, 林煥泽, 等. 气相色谱法测定砂仁等 5 味南药的农药残留量[J]. 中国药业, 2006, 15(1):63.
[12] 陈 波, 高 羽, 余敏灵, 等. 百合中乐果等 3 种农药残留的气相色谱-串联质谱法一测多评研究[J]. 中国药业, 2018, 27(21):27-30.

[13] 熊 颖, 李 纯, 任 晋, 等. SPE-LC-MS/MS 和 SPE-GC-MS/MS 测定绞股蓝中 109 种农药残留[J]. 中南药学, 2020, 18(12):2044-2049.
[14] 孙 仟, 林 林, 郭东晓, 等. UPLC-MS/MS 在中药材农残分析中的应用[J]. 药学研究, 2020, 39(7):420-423.
[15] 曾白琳, 陈启霞, 居明乔. 微量元素与中药功效的相关性分析[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(7):658.
[16] 秦俊法, 林宣贤. 中国的中药微量元素研究 II. 微量元素: 中药有效药成分的核心组分[J]. 广东微量元素科学, 2010, 17(12):1-12.

(收稿日期:2020-11-18;修回日期:2021-02-13)

的中药制剂严格按处方药管理。我国马兜铃科植物有46种,处方中含马兜铃属药材的中成药口服制剂有43种,虽然许多研究中都测定了中药材中马兜铃酸的含量,但目前尚无关于含马兜铃植物的中成药的报道,现行中成药标准均无控制马兜铃酸含量的标准。马兜铃酸I为马兜铃酸类化合物的主要毒性成分^[5-10],目前对于马兜铃酸类化合物的测定主要采用高效液相色谱(HPLC)法^[11-15]。由于中成药所含药味较多,成分复杂,且马兜铃酸I的含量较低,故本研究中采用超高效液相色谱串联质谱法测定中成药中马兜铃酸I的含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Acquity 型超高效液相色谱仪、Xevo TQ-S 型质谱仪(美国 Waters 公司);Auto Science 10200AD 型超声波清洗机(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);BSA 224S-CW 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂

13种58批样品(市售);马兜铃酸I对照品(中国食品药品检定研究院,批号为110746-201611,含量为98.9%);乙腈、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:0.1% 甲酸(含 10 mmol/L 甲酸铵, A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0~4 min 时 50% A, 4~7 min 时 10% A, 7~10 min 时 50% A);流速:0.3 mL/min;柱温:25℃;进样量:1.0 μL。

2.1.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子模式;干燥气:氮气;毛细管电压:3.2 kV;氮气流速:800 L/h;离子源温度:150℃;干燥气温度:550℃;多反应离子监测(MRM)模式:母离子 m/z 359.2, 子离子 m/z 296.0 (定量离子)、 m/z 324.0;碰撞电压:18, 20 V;区带电压:30, 30 V。

2.2 溶液制备

取马兜铃酸I对照品适量,精密称定,用70%甲醇制成质量浓度为0.1 mg/mL的对照品溶液。取装量差异项下供试品,粉碎成细粉,取适量,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声(功率为250 W,频率为33 kHz)处理30 min,放冷至室温,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇

匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。分别按制剂处方和工艺制备缺木香、马兜铃、寻骨风、天仙藤、朱砂莲、细辛的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下条件进样测定,记录色谱图及质谱图,详见图1、图2。结果阴性对照品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应保留时间处无干扰峰,表明专属性良好。

线性关系考察:分别精密量取2.2项下对照品溶液,用70%甲醇溶液稀释成质量浓度为0.046 55, 0.232 80, 0.931 00, 4.655 00, 9.310 00 μg/mL的系列对照品溶液。按2.1项下条件进样测定,记录峰面积。以马兜铃酸I质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 13\,222 X + 55.6$, $R^2 = 0.999\,9$ ($n = 5$)。结果表明,马兜铃酸I质量浓度在0.046 55~9.310 00 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限与检测限考察:分别精密量取2.2项下对照品溶液适量,倍比稀释,并按2.1项下条件进样测定,以信噪比(S/N)10:1和3:1分别计算定量限、检测限。结果定量限、检测限分别为0.05 ng和0.015 ng。

精密度试验:取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的RSD为1.60% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别于室温放置0, 2, 4, 8, 12 h时按2.1项下条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为1.30% ($n = 5$),表明供试品溶液在室温放置12 h内基本稳定。

重复性试验:精密称取同一批样品适量,各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为1.90% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

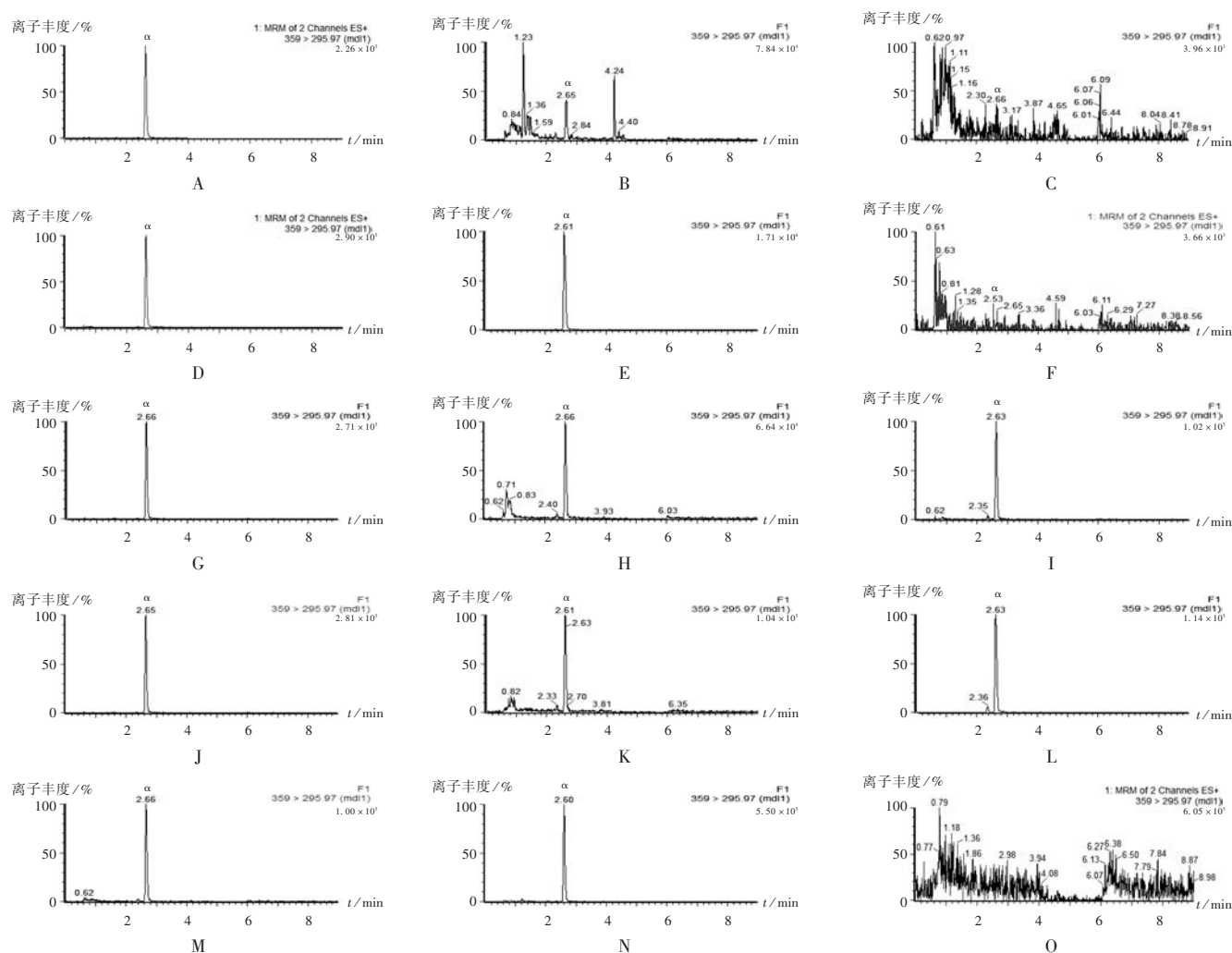
加样回收试验:取已知含量的样品适量,共6份,分别加入一定质量浓度的马兜铃酸I对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取58批样品各适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积,并计算样品含量。结果见表2。

3 讨论

本研究中检测的13种中成药中马兜铃酸I的含量



α. 马兜铃酸 I

A. 对照品溶液 B-N. 供试品溶液(依次为风湿止痛丸、九味牛黄丸、七味红花殊胜丸、清肺止咳丸、四味止泻木汤散、益肾蠲痹丸、三蛇药酒、祛风除湿药酒、和胃降逆胶囊、杜仲壮骨胶囊、杜仲壮骨丸、保胃胶囊、二十五味松石丸) O. 阴性对照品溶液

图1 离子流色谱图

α. aristolochic acid I

A. Reference solution B-N. Test solution(Fengshi Zhitong Pills, Jiuwei Niu Huang Pills, Qiwei Honghua Shusheng Pills, Qingfei Zhike Pills, Siwei Zhixiemu Decoction Powder, Yishen Juanbi Pills, Sanshe Medicinal Wine, Qufeng Chushi Medicinal Wine, Hewei Jiangni Capsules, Duzhong Zhuanggu Capsules, Duzhong Zhuanggu Pills, Baowei Capsules, Ershiwuwei Songshi Pills) O. Negative reference solution

Fig.1 Ion flow chromatograms

差异较大,主要原因是中药材的来源不同,每种中药材中马兜铃酸 I 的含量差异较大。另外,在国家允许的情况下,有些药材可替代使用,但使用过程中须注意交叉混淆、同物异名、同名异物等现象。为了保证用药安全,应注意做好对含马兜铃酸的药材和替代品应用的考察。

按欧盟标准,选择 1 个母离子和 2 个子离子,并依据子离子丰度比和化合物保留时间对马兜铃酸 I 进行定性分析。质谱中常选用的母离子有 $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M-H]^-$ 等。以直接进样的方式考察马兜铃酸 I 的质谱行为,结果母离子 $[M+NH_4]^+$ 在被打碎后进入二级质谱形成的子离子稳定性较好。马兜铃酸 I 母离子合

理丢失后形成响应较高的子离子分别为 m/z 296 $[M_1+H-NO_2]^+$, m/z 324 $[M_1+H-H_2O]^+$ 。利用 MRM 模式对选定的定性碎片离子进行离子传输电压、碰撞电压、倍增电压等参数优化,最终筛选出 m/z 359.2→296.0 为定量离子对, m/z 359.2→324.0 为定性离子对。按各个品种的处方和工艺制成阴性对照品,并加入适量的马兜铃酸 I 对照品,制成供试品溶液,测定各品种的方法检测限。同时,按处方和工艺制成阳性样品作为质控样品,以提高测定的准确性。

综上所述,所建立的方法专属性强,快速、灵敏,可用于中成药中马兜铃酸 I 的质量控制。

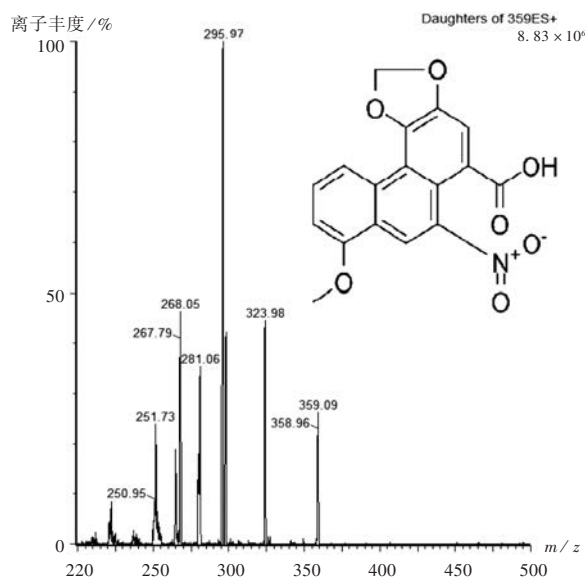


图2 马兜铃酸 I 的质谱图和结构式图

Fig. 2 The mass spectrum and chemical structures of aristolochic acid I

表1 马兜铃酸 I 加样回收试验结果 (n=6)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.254 2	0.098 6	0.098 5	0.201 7	104.67	100.49	2.29
0.258 9	0.100 4	0.098 5	0.197 5	98.58		
0.254 7	0.098 7	0.098 5	0.198 8	101.62		
0.251 4	0.097 5	0.098 5	0.195 7	99.70		
0.256 7	0.099 5	0.098 5	0.197 5	99.49		
0.253 5	0.098 3	0.098 5	0.195 7	98.88		

参考文献

- [1] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社,1997:16.
- [2] 负凯祎,徐志超,宋经元. 含马兜铃酸中药及其检测研究进展[J]. 中国科学生命科学,2019,49(3):238-249.
- [3] 刘西京,张恩户,郭惠玲. 朱砂七研究概况[J]. 陕西中医学院学报,2003,26(3):62-63.
- [4] 白景玲,陈秀芬,饶光宇,等. 朱砂莲药材的研究进展[J]. 贵阳中医学院学报,2007,29(1):62-63.
- [5] 王雪,刘为忠,沈云修,等. 寻骨风化学成分研究[J]. 山东农业科学,2010(4):34-36.
- [6] 扶教龙,刘佳,吴晨奇,等. 天仙藤化学成分分离纯化研究[J]. 上海农业学报,2014,30(6):116-119.
- [7] 李宏,坂神洋次,丸茂晋吾,等. 四川朱砂莲的化学成分研究[J]. 植物学报,1995,37(9):745-748.
- [8] 许玉琼,尚明英,葛跃伟,等. 马兜铃化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(21):2862-2865.
- [9] 王璘,潘竞先,贾忠建. 马兜铃属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2000,12(6):84-93.
- [10] 谭洪根,刘应泉. 北马兜铃根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,1994,19(11):677-678.

表2 样品中马兜铃酸 I 的含量测定结果 (μg/g, n=3)

Tab. 2 Determination results of aristolochic acid I in the samples (μg/g, n=3)

制剂名称	检测限	含量	拟限量	制剂名称	检测限	含量	拟限量
风湿止痛丸		0.58		杜仲壮骨胶囊		1.52	
风湿止痛丸		0.59	0.70	杜仲壮骨胶囊		1.60	
风湿止痛丸		0.60		杜仲壮骨胶囊		1.64	
九味牛黄丸	0.12	-	0	杜仲壮骨胶囊		0.71	
九味牛黄丸	0.12	-	0	杜仲壮骨胶囊		1.78	3.60
七味红花殊胜丸	0.16	388	400	杜仲壮骨胶囊		3.55	
七味红花殊胜丸	0.16	-	400	杜仲壮骨胶囊		2.01	
清肺止咳丸	0.18	171		杜仲壮骨胶囊		1.41	
清肺止咳丸	0.18	191		杜仲壮骨胶囊		3.60	
清肺止咳丸	0.18	-	230	杜仲壮骨丸		2.94	
清肺止咳丸	0.18	232		杜仲壮骨丸		2.98	
清肺止咳丸	0.18	169		杜仲壮骨丸		2.98	
四味止泻木汤散	0.12	-	0	杜仲壮骨丸		2.91	3.00
益肾调痹丸		2.33		杜仲壮骨丸		2.08	
益肾调痹丸		2.88		杜仲壮骨丸		3.56	
益肾调痹丸		3.51	3.00	保胃胶囊		661	
益肾调痹丸		2.88		保胃胶囊		621	
益肾调痹丸		2.40		保胃胶囊		675	680
三蛇药酒 ^a		0.26 ^a		保胃胶囊		622	
三蛇药酒		0.51 ^a	0.5	保胃胶囊		613	
三蛇药酒		0.49 ^a		保胃胶囊		601	
祛风除湿药酒 ^a		0.51 ^a		二十五味松石丸	0.15	-	
祛风除湿药酒		2.01 ^a	2.00	二十五味松石丸	0.15	91	
和胃降逆胶囊	0.15	3.71		二十五味松石丸	0.15	111	
和胃降逆胶囊	0.15	3.35		二十五味松石丸	0.15	90	110
和胃降逆胶囊	0.15	3.66	3.90	二十五味松石丸	0.15	98	
和胃降逆胶囊	0.15	-		二十五味松石丸	0.15	101	
和胃降逆胶囊	0.15	3.41		二十五味松石丸	0.15	-	
和胃降逆胶囊	0.15	3.66		二十五味松石丸	0.15	-	

注: -表示未检出,带#数据单位为 μg/mL。

Note: - indicates that no aristolochic acid I is detected, the unit of data with # is μg/mL.

- [11] 周围,周小平,刘红卫,等. 中成药中马兜铃酸 A 的 HPLC/MS 分析方法[J]. 化学研究,2005,16(4):80-82.
- [12] 梁志毅,谢菲,何健,等. HPLC 法测定马兜铃蜜炙过程中马兜铃酸 A 的含量变化[J]. 广东药学院学报,2012,28(6):628-631.
- [13] 陈益生,肖晨栋,郑浩. 薄层扫描法测定清淋冲剂中马兜铃酸的含量[J]. 华西药学杂志,2000,15(3):236-237.
- [14] 刘丽芳,曹素萍,及莹,等. 中药材及中成药中马兜铃酸类成分的定性、定量分析[J]. 中成药,2005,27(8):938-941.
- [15] 章莹,肖榕,黄杰,等. 不同产地马兜铃蜜炙前后 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国药理学杂志,2017,52(16):1397-1402.

(收稿日期:2020-09-23;修回日期:2021-01-29)