

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.19.020

超高效液相色谱-串联质谱法检测风痛安胶囊中马兜铃酸 I *

刘东升^{1,2}, 杨平荣^{1,2}, 姚世霞^{1,2}, 贺军权^{1,2}, 朱旭江^{1,2,Δ}

(1. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃 兰州 730070; 2. 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室, 甘肃 兰州 730030)

摘要:目的 建立测定风痛安胶囊中马兜铃酸 I 含量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法。方法 色谱柱为 Shim pack GIST HP C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 3.0 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液(含 5 mmol/L 甲酸铵), 梯度洗脱(0~15 min 时 35% A~40% A, 15~28 min 时 40% A~65% A, 28~30 min 时 65% A~95% A), 流速为 0.2 mL/min, 柱温为 40℃, 进样量为 2 μL。结果 马兜铃酸 I 峰均能与其他相邻峰良好分离; 马兜铃酸 I 质量浓度在 0.047 6~3.804 1 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 8$); 精密度、稳定性、重复性试验的结果均符合要求; 平均回收率为 99.14%, RSD 为 1.97% ($n=6$)。结论 该方法操作简便、快速, 结果准确, 灵敏度高, 可用于风痛安胶囊中马兜铃酸 I 成分的检测。

关键词: 风痛安胶囊; 马兜铃酸 I; 超高效液相色谱-串联质谱法; 质量控制

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)19-0077-04

Determination of Aristolochic Acid I in Fengtong'an Capsules by UPLC-MS/MS

LIU Dongsheng^{1,2}, YANG Pingrong^{1,2}, YAO Shixia^{1,2}, HE Junquan^{1,2}, ZHU Xujiang^{1,2,Δ}

(1. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou, Gansu, China 730070; 2. State Drug Administration - Key Laboratory of Quality Control of Chinese Medicinal Materials and Decoction Pieces, Lanzhou, Gansu, China 730030)

Abstract: Objective To establish an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS) method for the determination of aristolochic acid I in Fengtong'an Capsules. Methods The chromatographic column was Shim pack GIST HP C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 3.0 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% formic acid solution(containing 5 mmol/L ammonium formate) with gradient elution(0-15 min, 35% A-40% A; 15-28 min, 40% A-65% A; 28-30 min, 65% A-95% A), the flow rate was 0.2 mL/min, the column temperature was 40℃, and the injection volume was 2 μL. Results The peak of aristolochic acid I could be well separated from other adjacent peaks. The mass concentration of aristolochic acid I showed a good linear relationship with the peak area in the range of 0.047 6-3.804 1 μg/mL($r=0.999\ 8$). The results of the precision, stability and repeatability tests met the requirements. The average recovery of aristolochic acid I was 99.14% with RSD of 1.97% ($n=6$). Conclusion The method is simple, rapid, accurate and sensitive, which can be used for the determination of aristolochic acid I in Fengtong'an Capsules.

Key words: Fengtong'an Capsules; aristolochic acid I; UPLC-MS/MS; quality control

风痛安胶囊由防己、通草、桂枝等 12 种中药组方, 用于湿热阻络所致痹病, 症见关节红肿热痛、肌肉酸楚, 是治疗急、慢性风湿性关节炎的非处方药^[1], 现行质量标准为 2020 年版《中国药典(一部)》中的相关标准。防己为防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根, 主要有效成分为粉防己碱、去甲基粉防己碱、轮环藤酚碱、防己诺林碱等, 具有利尿消肿、祛风止痛之功效^[2]。其来源复杂, 品种较多, 且各地用药习惯不同, 造

成同物异名或同名异物, 药农误采或有意混采等诸多原因造成市场上经常出现以同属植物的根冒充防己, 或用马兜铃科植物的根或茎与防己混用现象, 与正品防己的功效、主治相差较大^[3-5], 尤其是用马兜铃科防己(汉中防己、广防己、宜宾防己、冕宁防己)代替防己药材进行投料时易造成用药安全问题。马兜铃科植物中含马兜铃酸类物质马兜铃酸(AAs)和马兜铃内酰胺(ALs), 具有肾毒性、致癌和致基因突变作用^[6-8], 含马兜铃酸类物

*基金项目: 甘肃省食品药品青年科技创新项目[2018GSFDA037]。

第一作者: 刘东升, 男, 硕士, 工程师, 研究方向为药物分析与质量标准, (电子信箱)1067664197@qq.com。

Δ通信作者: 朱旭江, 女, 博士, 主任药师, 研究方向为药物分析与质量标准, (电子信箱)1078751173@qq.com。

- [7] 宫玉婷, 刘晓倩, 陈雅然. 高效液相色谱法测定左金丸和左金胶囊中 9 种成分含量[J]. 中国药业, 2020, 29(23): 56-59.
- [8] 刘本涛, 袁彩英, 黄嘉咏, 等. 化香树果序化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(21): 227-234.
- [9] 孙正华, 邵晶, 郭玫. 黄芪化学成分及药理作用研究进

- 展[J]. 中医临床研究, 2015, 7(25): 22-25.
- [10] 刘双利, 姜程曦, 赵岩, 等. 防风化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(10): 2146-2152.
- [11] 李娜, 邵国泉, 王文建, 等. 夏枯草药理作用研究进展[J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2019, 35(12): 26-27.
- (收稿日期: 2020-12-22; 修回日期: 2021-02-19)

质的药用植物和制剂因此被多数国家禁用,我国先后取消了关木通、广防己和青木香的药用标准,并要求含马兜铃、寻骨风、天仙藤和朱砂莲的中药制剂严格按处方药管理。目前,马兜铃酸类物质含量较低的中药或植物药仍在使⤵用。本研究中采用液质联用法^[9-16]对风痛安胶囊中可能存在的马兜铃酸 I 进行研究,发现部分生产企业生产的风痛安胶囊样品中检出马兜铃酸 I。依据原国家食品药品监督管理局药品补充检验方法研制指南、2020 年版《中国药典(一部)》中马兜铃酸 I 的限量检查方法及相关文献报道,并结合样品特点,建立了测定风痛安胶囊中马兜铃酸 I 含量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LCMS-8045 型三重四极杆液质联用仪(日本岛津公司);TQ5500 型三重四极杆液质联用仪(AB SCIEX);Waters e2695 液相色谱仪(美国沃特世公司);ME204 型分析天平(精度为 0.01 mg),MS205DU 型分析天平(精度为 0.01 mg),均购于梅特勒-托利多公司;KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 500 W,频率为 40 kHz);10~1 000 μ L Eppendorf 加样枪(德国艾本德公司,规格为 10, 100 μ L)。

1.2 试剂

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、甲酸铵为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。2018 年马兜铃酸国家专项抽验中共 7 家企业、23 批风痛安胶囊样品,其批号和生产厂家见表 1。

表 1 样品批号及生产厂家信息

Tab. 1 The batch number of samples and the information of manufacturers

序号	生产厂家	批号	序号	生产厂家	批号	序号	生产厂家	批号
1	A	20160201	9	C	170401	17	E	170302
2	B	161201	10	D	20150901	18	E	180501
3	B	170201	11	D	20151101	19	F	161101
4	B	171102	12	D	20151102	20	C	171201
5	B	180102	13	D	20151103	21	G	20160701
6	B	180201	14	E	150701	22	G	20160702
7	B	160101	15	E	170101	23	G	20170502
8	B	171101	16	E	170301			

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Shim pack GIST HP C₁₈ 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.0 μ m);流动相:乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(含 5 mmol/L 甲酸铵)(B),梯度洗脱(0~15 min 时 35% A~

40% A, 15~28 min 时 40% A~65% A, 28~30 min 时 65% A~95% A);流速:0.2 mL/min;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:2 μ L。

2.1.2 质谱条件

电喷雾离子源:正离子扫描,多反应监测模式;干燥气温度:350 $^{\circ}$ C;干燥气流速:10 L/min;雾化气压力:30 psi;源电压:4 000 V;保留时间:16 min;定量离子:母离子质荷比(m/z)359.0,子离子 m/z 298.0;定性离子:子离子 m/z 296.0。

2.2 溶液制备

取马兜铃酸 I 对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 100 μ g 的溶液,作为马兜铃酸 I 对照品贮备液。取样品 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,称定质量,超声提取(功率为 250 W,频率为 40 kHz)40 min,放冷至室温后用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,静置,取上清液,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方及工艺制备缺防己药材的阴性样品,取 1 g,精密称定,按供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液(基质溶液)。取含广防己的风痛安胶囊内容物 1 g,精密称定,按供试品溶液制备方法制备阳性样品溶液。

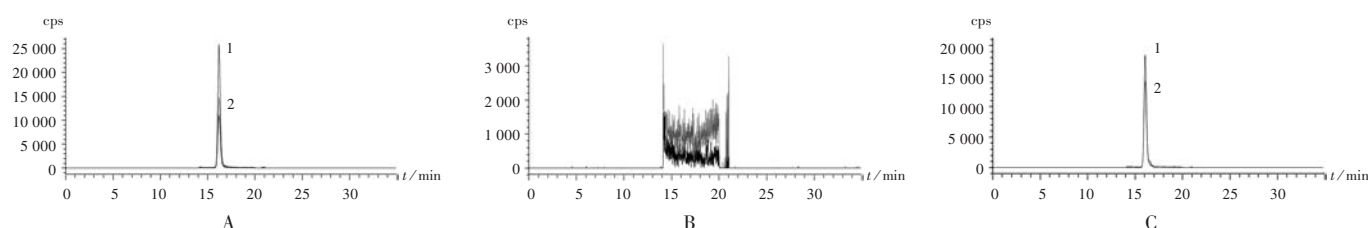
2.3 方法学考察

专属性试验:选择 m/z 359.0 $\rightarrow$ 298.0 和 359.0 $\rightarrow$ 296.0 作为马兜铃酸 I 检测离子对进行测定。结果在阳性样品溶液色谱中,与马兜铃酸 I 对照品溶液色谱相应保留时间均呈现离子流色谱峰;而阴性样品溶液色谱中,在与马兜铃酸 I 对照品色谱相应保留时间均无相应离子流色谱峰。可见,样品中其他药味对测定无干扰。马兜铃酸 I 对照品、阴性样品和阳性样品溶液的典型离子色谱图见图 1。

线性关系考察:精密吸取 2.3 项下对照品贮备液适量,用甲醇和基质溶液分别稀释成 0.047 6, 0.237 8, 0.475 5, 0.951 0, 1.902 0, 3.804 1 μ g/mL 系列对照品溶液,依法进样测定。以对照品溶液质量浓度(X , μ g/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 1\,448\,364.136X - 152\,512.526$, $r = 0.999\,8$ ($n = 6$),结果表明,马兜铃酸 I 质量浓度在 0.047 6~3.804 1 μ g/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一批样品(厂家 E,批号为 170101),依法制备供试品溶液,注入液相色谱仪,重复进样 6 次。结果马兜铃酸 I 峰面积的 RSD 为 1.32% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批样品(厂家 E,批号为 170101),依法制备供试品溶液,室温下放置 0, 6, 12, 16, 20, 24 h 时分别进样测定。结果马兜铃酸 I 峰面积的 RSD 为 2.94% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定。



1. m/z 359.0→298.0 2. m/z 359.0→296.0

A. 阴性样品溶液 B. 对照品溶液 C. 阳性样品溶液

图1 离子色谱图

1. m/z 359.0→298.0 2. m/z 359.0→296.0

A. Negative sample solution B. Reference solution C. Positive sample solution

Fig. 1 Ion chromatograms

重复性试验:取同一批样品(厂家E,批号为170101),依法制备供试品溶液,共6份,按2.1项下色谱条件测定,并计算样品中待测成分的含量。结果马兜铃酸I含量的RSD为2.23% ($n=6$),表明方法重复性良好。

回收试验:精密量取线性关系考察项下对照品溶液(质量浓度为3.8041 $\mu\text{g/mL}$)2.5 mL,置具塞锥形瓶中,氮气吹干,取已知含量的样品(厂家E,批号为170301)0.5 g,精密称定,平行6份,制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定含量,并计算回收率。结果平均回收率为99.14%,RSD为1.97% ($n=6$)。

仪器及方法检测限确定:以线性关系考察项下溶液图谱计算信噪比(S/N)为3时的仪器检测限为1.98 ng/mL。取阴性样品1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入一定质量浓度马兜铃酸I对照品溶液1 mL,精密加入70%甲醇24 mL,称定质量。超声提取40 min,放冷至室温,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,静置,取上清液滤过,取续滤液,即得。进样测定,以 S/N 为3:1时确定检测限为1.98 ng/mL,故本品方法检测限为2 μg 。

耐用性试验:取同一批样品(厂家E,批号为170101),依法制备供试品溶液,在其他色谱条件不变的情况下,分别采用岛津LCMS-8045型和AB SCIEX TQ-5500型三重四极杆液质联用仪测定马兜铃酸I的含量。结果的RSD为2.31%,表明不同仪器对结果的影响较小。

2.4 样品含量测定

按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下液相色谱与质谱条件进样测定。结果厂家B(批号为160101)、厂家D(批号为20150901)、厂家E(批号为170101和170301)中检出马兜铃酸I的含量分别为17.40,14.53,24.70,19.63 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

3.1 检测方法选择

参照中国药典和文献[14],采用高效液相色谱(HPLC)法测定样品中马兜铃酸I的含量。结果部分样品检出与马兜铃酸I对照品相应保留时间的色谱峰,且

紫外吸收光谱与马兜铃酸I对照品一致(采用二极管阵列检测器在200~400 nm波长范围内进行紫外吸收光谱扫描,马兜铃酸I对照品分别于389,318,250,223 nm波长处有吸收峰)。进一步试验发现,采用HPLC法对样品中的马兜铃酸I进行含量测定,方法回收率低于50%。分析原因可能是,处方成分复杂,且马兜铃酸I含量较低,在样品提取和浓缩过程中盐酸、三氯甲烷等易制毒试剂使用量较大。故采用样品前处理简单且测定过程不易受干扰的UPLC-MS/MS法测定样品中马兜铃酸I的含量。

3.2 基质效应考察

UPLC-MS/MS中,样品中的基质受待测成分电离的影响,测定结果发生一定变化。为了进一步考察样品基质对测定结果的影响,分别以相应质量浓度的风痛安胶囊阴性样品基质溶液和甲醇配制相应的对照品溶液进行比较,通过考察线性关系,发现风痛安胶囊阴性样品基质对待测成分的电离响应值影响不明显,故忽略基质效应的影响,直接以甲醇为溶剂进行对照品溶液制备和线性关系考察。

3.3 检测离子对选择

考察文献[9-16]和前期预试验,显示多采用正离子、多反应监测模式,以乙腈-0.1%甲酸(含5 mmol/L甲酸铵)溶液为流动相,母离子以 m/z 359.0为主,子离子有 m/z 298.0, m/z 296.0, m/z 324.0, m/z 268.0等。但碎片离子 m/z 298.0丰度最强,其次为碎片离子 m/z 296.0,故最终选择质谱检测器,电喷雾正离子模式,进行多反应监测,选择 m/z 359.0→298.0为定量离子、 m/z 359.0→296.0为定性离子。

3.4 风险控制

参照2020年版《中国药典(一部)》中与马兜铃酸I的限量检查相关的方法,结合样品特点,采用液-质联用法建立的风痛安胶囊中马兜铃酸I的检查方法,对7家企业23批风痛安胶囊样品中马兜铃酸I进行检查,其中3家企业4批样品中检出马兜铃酸I,检出率为17.39%。说明该品种的中药存在含有马兜铃酸类成分